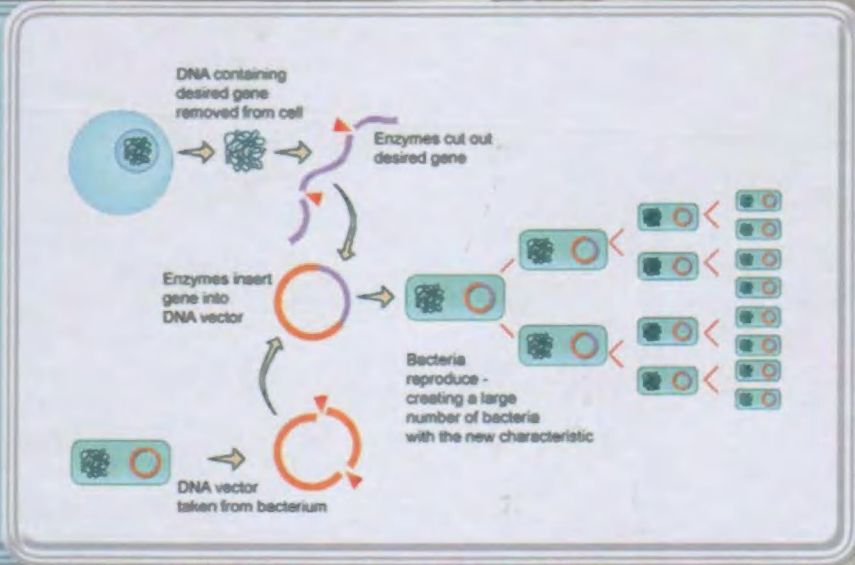


مدخل الى تطبيقات الهندسة الوراثية في الطب العدلي

منتدى إقرأ الثقافي
www.iqra.ahlamontada.com

الأستاذ الدكتور
علي حمود السعدي



www.darsafa.net



مؤسسة دار الصادق الثقافية
طبع - نشر - توزيع

بۆدابهزاندنی چۆرمها کتیب:سەردانی: (مُنْتَدَى إِقْرَأَ الثَّقَافِي)

لتحميل انواع الكتب راجع: (مُنْتَدَى إِقْرَأَ الثَّقَافِي)

پەڕەي دانلود کتایهەای مەخّەلف مەراجەه: (منتدی اقرا الثقافی)

www.iqra.ahlamontada.com



www.iqra.ahlamontada.com

للكتيب (کوردی ، عربی ، فارسی)



﴿ وَقُلْ أَعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ ﴾

مدخل إلى تطبيقات الهندسة الوراثية
في الطب العدلي

مدخل إلى تطبيقات الهندسة الوراثية في الطب العدلي

الأستاذ الدكتور

علي حمود السعدي

أستاذ الهندسة الوراثية والوراثة البشرية

كلية العلوم - جامعة بابل

الطبعة الأولى

2011 م - 1432 هـ



مؤسسة دار الصادق الثقافية
طبع، نشر، توزيع



دار صفاء للنشر والتوزيع - عمان

المملكة الأردنية الهاشمية
رقم الإيداع لدى دائرة المكتبة الوطنية (2010 / 8 / 3016)

660.65

السعدي، علي حمود
مدخل إلى تطبيقات الهندسة الوراثية في الطب العدلي / علي حمود السعدي -
عمان: دار صفاء للنشر والتوزيع 2010.

() ص

ر. أ: 2010 / 8 / 3016

الواصفات: الهندسة الوراثية // علم الوراثة

* - تم اعداد بيانات الفهرسة الأولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية

حقوق الطبع محفوظة للناسر

Copyright ©
All rights reserved

الطبعة الأولى

2011م - 1432هـ



مؤسسة دار الصادق الثقافية

طبع، نشر، توزيع

العراق - بابل - الحلة

الفرع الأول، الحلة - شارع ابو القاسم - مجمع الزهور.

نقال : 009647801233129

الفرع الثاني: الحلة - شارع ابو القاسم، مقابل

مسجد ابن نما.

نقال : 009647803087758

E - Mail : alssadiq@yahoo.com



دار صفاء للنشر والتوزيع

عمان - شارع الملك حسين - مجمع النخيم التجاري

تلفاكس: +962 6 4612190 هاتف: +962 6 4611169

ص. ب 922762 عمان - 11192 الاردن

DAR SAFA Publishing - Distributing

Telefax: + 962 6 4612190 Tel: + 962 6 4611169

P.O.Box: 922762 Amman 11192 - Jordan

<http://www.darsafa.net>

E-mail: safa@darsafa.net

ردمك 2- 679-24-9957-978 ISBN

وَتَزْعُمُ أَنَّكَ جُزْمٌ صَغِيرٌ
وَفِيكَ أَنْطَوَى الْعَالَمِ الْأَكْبَرُ

الإمام علي بن أبي طالب

الاهدا،

في غربتي كنت...

أتذكر بصرك العراق يا أبي

وأرى بوجهك سلوتي يا أمي

وأأمل جمال عشتار وأسرتي

وأثق بخير دجلة والفرات يا معلمي

الفهرس

19..... تقديم

23..... الفصل الأول المقدمة

الفصل الثاني

كيمياء وتنظيم الأحماض النووية والتعبير الجيني

31..... Types of the cells أنواع الخلايا

31..... Prokaryotes بدائيات النواة أ.

31..... Eukaryotes حقيقيات النواة ب.

32..... Nucleic acids الأحماض النووية

32..... DNA Structure of deoxyribonucleic acid تركيب الـ DNA

41..... Chromatin organization تنظيم الكروماتين

42..... Nucleosome النيوكليوسوم

46..... Nucleus النواة

46..... Nucleolus النوية

47..... Nuclear matrix الحشوة النووية

47..... Function of the Nucleus وظائف النواة

47..... Mitochondrial DNA الـ DNA المايكوندريا

48..... Metaphase chromosomes كروموسومات الطور الاستوائي

50..... Gene concept مفهوم الجين

51..... DNA تصنيع الـ DNA تضاعف

52..... الإنزيمات المشاركة في تضاعف الـ DNA

- 54.....DNA Sites of DNA replication مواقع تضاعف الـ
- 55.....DNA إنزيمات أخرى في حقيقيات النواة تشترك في تضاعف الـ
- 56.....Steps of replication خطوات التضاعف
- 59.....التيلومير القطعة الطرفية وإنزيم التيلوميريز
- 61.....علاقة الوراثة بطول العمر ودور التيلوميرات
- 64.....Flow of genetic information انسياب المعلومات الوراثية
- 66.....RNA synthesis Transcription تصنيع الـ RNA الاستنساخ
- 67.....وظيفة وتركيب حفّاز الجين
- 67.....Prokaryotic promoter حفّاز بدائيات النواة
- 69.....عناصر استجابة الجين المُشجّع أو الخامد
- 70.....RNA RNA polymerase إنزيم بلمرة الـ RNA
- 71.....Steps of transcription خطوات الاستنساخ
- 74.....المضادات الحيوية المثبّطة لعملية الاستنساخ
- 74.....التحويلات بعد الاستنساخ التي على الـ RNA
- 77.....mRNA Half-life of mRNA عمر النصف للـ mRNA
- 77.....الاختلافات بين mRNA في بدائيات وحقيقيات النواة
- 79.....Characters of the genetic code صفات الشفرة الوراثية
- 81.....فرضية تذبذب اهتزاز كريك
- 82.....Protein synthesis تصنيع البروتين
- 82.....Requirements for protein synthesis مُتطلبات تصنيع البروتين
- 88.....التحويلات التي تطرأ على البروتينات بعد الاستنساخ
- 88.....تأثير المضادات الحيوية في عملية تصنيع البروتين
- 89.....مرض جنون البقر الاعتلال الدماغي الأسفنجي

الفصل الثالث

مستويات تنظيم الـ DNA في الكروموسوم

- جينومات حقيقيات النواة تُظهر تنظيم تسلسل مُعقد يتميز بالـ DNA المتكرر... 101
- الـ DNA المتكرر و DNA التوابع 103
- تسلسلات الـ DNA السنتروميري Centromeric DNA sequences 105
- تسلسلات الـ DNA الطرفي التيلوميري Telomeric DNA sequences 106
- التسلسلات متوسطة التكرار VNTRs والمتكررات ثنائية النيوكليوتيدات 107
- التسلسلات القفازة المُنتقلة المتكررة 108
- الجينات عديدة النسخ ذات التكرار المتوسط 110
- الـ DNA المايكوكوندريا والكلوروبلاست 111

الفصل الرابع

تداول الأحماض النووية

- استخلاص الـ DNA والـ RNA 119
- تداول وتقدير كمية الأحماض النووية 121
- التوسيم الإشعاعي للأحماض وصناعة المحسّات 122
- التوسيم الطرفي End labeling 122
- ترجمة الشفرة Nick translation 123
- التوسيم بإطالة البادئ Labeling by primer extension 124
- التهجين الجزيئي للـ DNA 125
- الترحيل الكهربائي الهلامي 127
- دراسة تسلسل الـ DNA DNA sequencing 131
- طريقة Maxam – Gilbert الكيماوية 131
- طريقة Sanger – Coulson الإنزيمية 133

الفصل الخامس

إنزيمات التداول مع الـDNA

141.....	نزيات قطع الـDNA
143.....	الإنزيات القاطعة من النوع الثاني
145.....	استعمال الإنزيات القاطعة من النوع الثاني
148.....	تحديد الخريطة بوساطة الإنزيات القاطعة Restriction mapping
151.....	الإنزيات المَحَوِّرة
151.....	إنزيات الـNucleases
152.....	إنزيات البلمرة Polymerases
154.....	الإنزيات المَحَوِّرة لأطراف الـDNA
154.....	إنزيات اللحم اللصق

الفصل السادس

لمحة عن بعض خطط الاستنسال الكلونة Cloning

159.....	الاستنسال من الـmRNA
160.....	صناعة الـDNA المكمل cDNA
163.....	المكتبة الجينومية
165.....	تحضير قطع الـDNA
167.....	إكثار المكتبات الجينومية
170.....	تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل PCR Polymerase chain reaction
171.....	نظرة عامة
174.....	خطوات إجراء البلمرة PCR
174.....	تصميم البادئين

176.....	ضبط درجات حرارة الـ PCR
178.....	دراسة نواتج البلمرة الـ PCR
184.....	أخطاء الإنزيم Taq polymerase
186.....	تطبيقات تفاعل الـ PCR
186.....	استعمال الـ PCR في دراسة كمية قليلة من الـ DNA
187.....	الـ PCR والتشخيص الطبي
189.....	مقارنة الجينومات المختلفة
190.....	التهجين الجزيئي
190.....	مجسات الحامض النووي Nucleic acid probes
192.....	فحص بنوك الاستنسال
194.....	الكشف المناعي
196.....	خرائط التقطيع الإنزيمي
196.....	تقنيات وصمة التهجين Blotting techniques
199.....	دراسة تسلسل الـ DNA DNA sequencing
200.....	فصل الكروموسومات بالترحيل الكهربائي
202.....	التباين في أطوال قطع التقيد RFLP

الفصل السابع

تباين الـ DNA وأنواع المجسات المستعملة في العلوم الجنائية

- 217..... تباين الـ DNA وأنواع المجسات المستعملة في العلوم الجنائية
- 217..... أنواع الـ DNA Types of DNA
- 221..... التغيرات التي يُعتمد عليها في إجراء البصمة الجينية
- 221..... 1. البصمة المعتمدة على التغيرات العددي في تنوعات التكرارات المترادفة.
- 229..... 2. البصمة المعتمدة على التتابع الكروموسومية الدقيقة
- 231..... المجسات المستعملة في العلوم الجنائية
- 231..... 1. المجسات أحادية الموقع Single-locus probes
- 233..... 2. المجسات متعددة المواقع Multiple-loci probes

الفصل الثامن

مصادر الـ DNA وإجراء البصمة الجينية

- 241..... اكتشاف بصمة الـ DNA
- 244..... المصادر المهمة للحصول على الـ DNA في التطبيقات الجنائية
- 249..... تنقية الـ DNA
- 250..... التعامل مع العينات الإثباتية
- 250..... أ. الدم Blood
- 251..... ب. السائل المنوي Semen
- 251..... ج. الأنسجة الرخوة Soft tissues
- 251..... د. الأنسجة المجمدة Frozen tissue
- 252..... هـ. العظام Bones نخاع العظم والمادة البينية
- 252..... و. العينات المحفوظة بالفورمالين Formalin samples

252.....	Paraffin-embedded tissues	ز. الأنسجة لمطمورة بالبرافين
253.....	Types of samples	أنواع العينات
253.....	Crime scene	1. عينات مسرح الجريمة
253.....	Reference samples	2. عينات مرجعية
256.....		جمع العينات
257.....	Sex determination	تحديد الجنس
258.....		1. الإنزيمات القاطعة
258.....	Soil contamination	2. تلوث بالتربة
258.....	DNA بفعل عوامل بيئية	3. تحطّم في الـ
259.....	Preservation of forensic evidence	حفظ الأدلة الجنائية
259.....		أ. حفظ الدم
259.....		ب. حفظ الأنسجة
259.....	PCR	تضخيم الـ DNA باستخدام تقنية الـ
264.....	DNA	خطوات إجراء البصمة الوراثية للـ
264.....	DNA DNA extraction	1. استخلاص الـ
264.....	DNA	2. تقطيع الـ DNA بإنزيم قاطع
265.....		3. الترحيل الكهربائي في هلام الأجاروز
265.....	Preparation of Southern blot	4. تحضير وصمة سودرن
265.....		5. التهجين مع مجس مُعلّم إشعاعياً
266.....	RFLPs	6. تحديد الـ بوساطة التصوير الإشعاعي الذاتي
266.....		7. إعادة وصمة سودرن مع مجسات إضافية
267.....	RFLPs as genetic markers	الـ كمعلّيات وراثية
270.....	DNA Fingerprints	بصمات الـ

- 271..... طرق تحليل البصمة الوراثية
- 282..... إحدى الاستراتيجيات المتبعة من قبل جيفري لإنشاء مجلس

الفصل التاسع

تطبيقات وأبعاد البصمة الجينية

- 287..... بعض الاعتبارات الجنائية المتعلقة بالبصمة الجينية
- 290..... العلاقة بين الطرق التقليدية والبصمة الجينية في كشف الجريمة
- 294..... البصمة الجينية والقضايا العدلية
- 296..... البصمة الجينية واختبار الأبوة (Paternity test) أو ادعاء النسب
- 302..... تطبيقات البصمة الجينية في الكائنات الأخرى
- 303..... أمثلة على حوادث طبقت فيها البصمة الجينية في كشف أسرار الجريمة
- 311..... الفصل العاشر الضوابط القانونية وبناء البنوك المعلوماتية للبصمة الجينية

الفصل الحادي عشر

دراسة مسرح الجريمة

- 317..... فحص موقع الجريمة
- 318..... فحص الجثة The Autopsy
- 319..... الطب العدلي وعلم الأمراض Forensic pathology
- 319..... أ. سبب وطريقة الوفاة وظروفها
- 320..... تحديد وقت الموت والتحلل
- 320..... تحديد وقت الموت
- 324..... ب. التحلل Decomposition
- 325..... مسرح وأداة الجريمة
- 328..... التعرف على بقايا

328.....	أهمية الدماء.....
329.....	التزف.....
329.....	السلاح وموقع الجريمة.....
330.....	الدم وموقع الجريمة.....
330.....	تحديد زمن الوفاة من الموقع.....
332.....	مواقع الحريق.....
332.....	الانفجارات الضخمة.....
333.....	مواقع التسمم بالغاز.....
334.....	التسمم بالمبيدات والمعادن الثقيلة.....
335.....	السقوط من ارتفاع.....
335.....	حوادث الغرق.....
336.....	حوادث الطرق.....
338.....	حوادث القطارات.....
341.....	المصادر.....

تقديم

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَفِي الْأَرْضِ آيَاتٌ لِلْمُوقِنِينَ ﴿٢٠﴾ وَفِي أَنْفُسِكُمْ أَفَلَا تُبْصِرُونَ ﴿٢١﴾﴾

الذاريات: 20 - 21

مثلُ من آيات الرحمن تبارك عز وجل، لتكشف البحوث يوماً بعد يوم عن دقة الخالق وحكمته، إذ اتجهت الكثير من بحوث الهندسة الوراثية إلى إيجاد طرق ملائمة وكفوءة نحو تحديد بصمة الـ DNA (DNA fingerprint) لتشخيص الهوية البيولوجية كإرهاصات خاصة بكل فرد، لاسيما وأن الطرق التقليدية لم تمتلك الكفاءة والمرونة اللازمة لتحقيق هذا الغرض، نعم إنها هدية الله للعلم الجنائي.

فما أن أنزل آدم عليه السلام إلى الأرض، حتى حدثت أول جريمة قتل بين اثنين من أبنائه، عندما قتل قابيل أخيه هابيل ﴿فَطَوَّعَتْ لَهُ نَفْسُهُ قَتْلَ أَخِيهِ فَقَتَلَهُ فَأَصْبَحَ مِنَ الْخَاسِرِينَ﴾^(المائدة: 30). ومن حينها لم تنقطع الجريمة وظلت تُشكل همّاً من هموم البشرية إلى يومنا هذا، لذا وقف الإنسان أمام تلك التحديات التي تستهدف أمانه وحياته، وراح يُفتش عن كل الوسائل والمستلزمات المساعدة في حل ألغاز الجريمة، وسن القوانين والتشريعات لنشر الطمأنينة، وردع كل من تسوّّل له نفسه في القتل والإيذاء.

ومع زيادة أعداد السكان وتعقيدات الحياة وتطور البشرية ازدادت معدلات الجريمة وتطوّرت أساليب تنفيذها، كما ارتقت فنون والأعيب الإخفاء والمراوغة للإفلات من دلائل الكشف عنها، ورافق ذلك تقدّم متوازٍ في تطوّر التقنيات العلمية للإمساك بكل خيط يساعد القاضي في إصدار حكم عادل، الأمر الذي يتطلب العون لأكثر من شخص أو تخصص، وقد كانت الهندسة الوراثية الفجر الواعد الذي يُبشّر في حل أعقد الألغاز في مجال الجريمة.

كنتُ أكلّم نفسي ذات يوم، لماذا لا أقدم بطاقة مُعايدة إلى أحبّتي عندما توقفتُ عند كلماتٍ للشاعر سميح القاسم في قصيدة «بطاقات مُعايدة إلى الجهات الست»، تقول: أسوةً بالمساجين ضناً على ذمة البحث عن تُهمةٍ لائقة.....

إن تحمسي لتأليف كتاب (مدخل إلى تطبيقات الهندسة الوراثية في الطب العدلي) يعود إلى اعتقادي بأهمية توفر مثل هذا المصدر في المكتبة العربية، فضلاً عن كون هذا المجال لم يلقَ بعد نصيبه من الاهتمام بالنسبة للبرامج الدراسية في المؤسسات الأكاديمية العربية، على الرغم من أن تطبيقاته تُعدّ في غاية الأهمية، إذ يمكن أن يفيد طلبة كليات الطب والقانون والشرطة، وأقسام التقنيات الحيوية وعلوم الحياة في كليات العلوم وكليات ومراكز أخرى، كما أنه يوفر مجالاً علمياً خصباً للأطباء الممارسين وطلبة الدراسات العليا المتخصصين في الطب العدلي.

يصف هذا الكتاب أساسيات الأحياء الجزيئي وتقنيات الهندسة الوراثية بشيء من التركيز والتوضيح، بعيداً عن الاختصار المُخل والإسهاب المُمل، بالإضافة إلى المحاور الأساسية المتعلقة بتطويع تلك التقنيات في مجال العلوم العدلية (الشرعية)، من خلال استعراض مُبسّط لها لسهولة إيصالها للقارئ الكريم، إذ حاولت استعمال أكثر التعبيرات والمصطلحات والألفاظ العلمية شيوعاً في العالم العربي، وخصوصاً تلك المُتفق عليها، وعملت على ذكر المرادفات والمصطلحات المفهومة قدر الإمكان، والتي لا يوجد اتفاق عليها.

يقع الكتاب أحد عشر فصلاً، تناولت العشرة فصول الأولى منها تقنيات وتطبيقات الهندسة الوراثية في علم الطب العدلي، في حين تناول الفصل الحادي عشر دراسة موضوع مسرح الجريمة بأسلوب مُختص من أجل الفائدة العامة.

وهنا أجد لزاماً عليّ أن أتقدم بالشكر والعرفان إلى كل من مدّ يد العون والمساعدة، وأخص بالذكر أستاذي الفاضل أ. د. نصر فرحان عبد الله، الذي تعلّمت على يده روح البحث العلمي، ولا يفوتني معرفاناً ووفاءً شكر أساتذتي:

أ. د. علي عبد الرحمن الزعّاك، وأ. د. علاء يحيى الباقر، وأ. د. المرحوم فاروق يس العاني، الذين كان لهم الأثر الكبير في مسيرتي العلمية. كما أشكر أيضاً الأخ د. سعد

حمود السعدي، والزميلين العزيزين د. فهم عبد الكريم بن خيال، ود. حيدر كامل السعدي على المساعدة المعنوية الخالصة، مع تقديري وامتناني لكل من الدكتور عبد السلام موسى بو الحاج وعلي أبو بكر المساري على المساعدة العلمية القيمة. وأود أن أعتبر عن خالص شكري وتقديري للأخ أ. د. نبيل هاشم الأعرجي، رئيس جامعة بابل للمساندة المعنوية اللاحقة.

وأجد من الإحسان أن أضع قبلةً على أكف والديَّ علَّها تُعبرَ عن مثقال ذرة خير لينبوع عطائهما الذي لا ينضب.

ومودةً أتقدم بالشكر والمحبة إلى أسرتي: زوجتي العزيزة الدكتورة عشتار منعم المحنا، وأبنائي الحسن وزين العابدين، وبناتي زينب وزهراء، للدعم المعنوي وتميئة الأجواء الهادئة التي كانت على حساب الوقت الذي يعيشه الأب لعائلته. هذا ولا يفوتني أن أتقدم بالامتنان للأخ أحمد عبد العالي الكعبي الذي كان له فضلاً كبيراً في طباعة وإخراج هذا الكتاب.

كما أتوجه إلى القارئ الكريم بالتماس العذر والعفو، إذ لا أنزه نفسي من الخطأ أو السهو... راجياً أن أكون قد وفقت في تقديم هذا الجهد المتواضع بالقدر المعقول...

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿لَا يَكْفُرُ اللَّهُ نَفْسًا إِلَّا وُسْعَهَا لَهَا مَا كَسَبَتْ وَعَلَيْهَا مَا اكْتَسَبَتْ رَبَّنَا لَا تُؤَاخِذْنَا إِن سَبِّحْنَا أَوْ أَخْطَأْنَا رَبَّنَا وَلَا تَحْمِلْ عَلَيْنَا إَصْرًا كَمَا حَمَلْتَهُ عَلَى الَّذِينَ مِن قَبْلِنَا رَبَّنَا وَلَا تُحَمِّلْنَا مَا لَا طَاقَةَ لَنَا بِهِ وَاعْفُ عَنَّا وَارْحَمْنَا أَنْتَ مَوْلَانَا فَانصُرْنَا عَلَى الْقَوْمِ الْكَافِرِينَ﴾

البقرة : 286

أ. د. علي حمود محيسن السعدي

2010

الفصل الاول

المقدمة

الفصل الأول

المقدمة

لعلّ هذا التلازم التاريخي الوثيق بين التقنيات العلمية وتطبيقاتها، هو أهم نتاج للإرث الحضاري الذي أفاد البشرية، وقدّم لها شتى الخدمات دقّة وسرعة، وقد كان علم الطب العدلي (Forensic medicine) أو ما يُسمّى بالعلم الشرعي أو الجنائي (Forensic science)، واحداً من اختصاصات علمية مختلفة، محوراً مهماً لتلك التطبيقات.

لقد استعملت تقنيات الهندسة الوراثية، وخصوصاً في العشرين سنة الأخيرة من الحقبة الحالية بشكل واسع، كأداة مهمة في تقديم أدلة علمية دقيقة في الطب العدلي، مُتضمنة التعرف على الشخص القاتل، وتشخيص الأب الحقيقي للطفل موضع الشك (الذي مارست أمه الجماع مع أكثر من رجل)، وتحديد صلة القرابة وشرعية الأبوة والأمومة للأطفال (الناجمة عن التبديل المقصود أو غير المقصود للأطفال حديثي الولادة في صالات الولادة وأماكن أخرى)، وتحديد هوية الجثث المعرضة للتلف في حالات التنقل أو الإجرام. فعلى سبيل المثال لا الحصر، تُقدّم البصمة الجينية (بصمة الـ DNA fingerprint، DNA)، في حالات الشك الأبوي، دليلاً قوياً على العلاقات الوراثية العائلية، فشكل الحُزم (Bands) للفرد هي في الواقع جين ناتج عن كروموسومات الأب والأم، لذلك فإن بصمة DNA الطفل ستحتوي على حُزم تتشابه مع بعض الحُزم في بصمة الـ DNA لكل من الأب والأم.

سهلت بصمة الـ DNA المتحصّل عليها بالاعتماد على بقايا الخلايا والأنسجة المتّاحة في مسرح الجريمة (Crime scene)، مثل بُقع الدم أو النُطف (المأخوذة من الضحية المُغتصبة)، أو بُصيلات الشعر، أو الخلايا العالقة في أظافر الضحية، أو اللُّعاب، أو الإفرازات المهبلية.. الخ، كثيراً من مهمة رجال القضاء والأمن في حل عدد

من المشاكل القانونية المستعصية، إذ تُعدّ تقنية التباين في أطوال قطع التقييد RFLPs (Restriction fragment length polymorphisms)، وبمساعدة تقنية الـ PCR (Polymerase chain reaction)، وتقنيات مُكمّلة أخرى المحور العملي الأساسي لبصمة الـ DNA.

إن جوهر التباين في هذه البصمة يعتمد على التغيرات الموجودة في أعداد التكرارات المترادفة VNTRs التي تختلف من شخصٍ لآخر، بحيث تعتمد تلك الاختلافات بشكل أساسي على التغيرات الموجودة في جينوم الإنسان أو ما يُسمّى بالتوابع الكروموسومية الصغيرة (Minisatellites) والتوابع الكروموسومية الدقيقة (Microsatellites).

وطالما أن كل فرد يتمتع بـ DNA ثابت ومُتفرد، فإن إجراء بصمة الـ DNA يُستخدم بصورة مُقنعة وكفوءة للتعرف على هوية شخص ما في هذه المعمورة. وعليه يمكن القول بأن بصمة الـ DNA هي نمط مُتفرد، لا يتشابه فيها اثنان إلاّ التوائم الصنوية، الأمر الذي جعل منها قرينة من قرائن النفي والإثبات الغير قابلة للشك، والتي يُعتدّ فيها في غالبية المحاكم المدنية والجنائية في أوروبا وأمريكا ودول العالم المتقدم، في كثير من الجرائم المُعقّدة، كما أن عمليات تغيير معالم الوجه جراحياً، والتي نتوقع أن يلجأ إليها بعض المجرمين والمطلوبين للعدالة، وخصوصاً الشخصيات الإرهابية الخطيرة، في سبيل عدم التعرف والوصول إليهم، تُشكّل هي الأخرى تحدياً سهلاً أمام فعالية بصمة الـ DNA، وهي بهذا فتحت باباً واسعاً من المرونة والدقة في توفير الدليل القاطع والمانع لعمليات التضليل والتزوير للحقائق والأدلة.

هذا وعلى الرغم من الحداثة النسبية لتقنيات الهندسة الوراثية بشكل عام، وتطبيقاتها الجنائية بشكل خاص، إلاّ أن التطورات السريعة والمُتلاحقة في هذه التقنيات، فضلاً عن التحسينات التي أُدخلت عليها، قد أدت إلى تأكيد الثقة بتلك التطبيقات، ممّا زاد من أهميتها في مجال الكشف عن أسرار الجرائم، بحيث تنخفض نسبة التشابه بين أي شخصين إلى $1/10^5$ ، وتصل إلى $1/10^8$ ، مع العلم أننا نحتاج إلى كمية معقولة من الـ DNA تراوح بين 15 - مايكروغرام.

وإذا قلنا تقريباً أن فرصة تطابق فردين في بصمة الـ DNA غير ذي علاقة، هي 1 في المليون بليون، فإنها حتى في الأشخاص الأخوة (عدا التوائم الصنوية) هي 1 في كل 10000 مليون.

حقاً إن اختراع البصمة الوراثية كان من الإنجازات العلمية العظيمة في مجال القانون منذ استخدام بصمات الأصابع، وهي بالفعل نعمة وفضل من الله عز وجل، بوصفها وسيلة فعالة في إحقاق الحق وإزهاق الباطل، وفي توفير الأمان والشعور بالثقة للبشر الذين يوضعون في الزنانات، دون ذنب سوى الشك بأنهم مجرمين.

قال تعالى في كتابه الحكيم:

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَلَكُمْ فِي الْقِصَاصِ حَيَوةٌ يَتَأُولَىٰ الْأَلْبَبُ لَعَلَّكُمْ تَتَّقُونَ ﴾

الفصل الثاني

دراسات في الحوكمة المؤسسية والأداء المالي الاستراتيجي

الفصل الثاني

كيمياء وتنظيم الأحماض النووية والتعبير الجيني

يتضمن هذا الفصل معلومات عامة أساسية، ولكن من الممكن التطرق إلى بعض التفاصيل المتعلقة بها في فصول لاحقة.

أنواع الخلايا :Types of the cells

أ. بدائيات النواة Prokaryotes

لا تحتوي هذه الخلايا على عُضَيَّات مُحاطة بأغشية داخلية، فعلى سبيل المثال، لا يوجد غلاف نووي (Nuclear membrane) يُحيط بالمادة النووية والكروموسوم الذي يقع في جانب واحد من الخلية، ويلامس غشاء الخلية. كذلك لا توجد ماييتوكوندرية، ولذلك لا يوجد انقسام ميتوزي (Mitosis) في وضعيته التقليدية، إذ تمثل خلايا بدائيات النواة بالبكتيريا والطحالب الخضراء المزرقة (Blue-green algae). ومن الجدير بالذكر، أن هذه الخلايا قد تحتوي على DNA كروموسومي إضافي (Extra-chromosomal DNA) بهيئة DNA حلقي مزدوج الشريط يدعى بالبلازميدات، والتي تحمل جينات مهمة، مثل جينات المقاومة للعقاقير.

ب. حقيقيات النواة Eukaryotes

تحتوي هذه الخلايا على عُضَيَّات مُحاطة بأغشية داخلية، مثل الماييتوكوندرية، والأجسام الحالة (Lysosomes)، والنواة المُحاطة بالغلاف النووي الذي يُحيط بالكروماتين النووي، كما هو الحال في خلايا الخمائر والفطريات والنباتات واللافقرات (Invertebrates) والحيوانات. هذا ويوجد أيضاً DNA خارج نووي بهيئة جزيئات من أشرطة مزدوجة حلقة في الماييتوكوندرية أو البلاستيدات (أو ما يُسمى بجينوم الماييتوكوندرية أو جينوم البلاستيدة).

إن المعلومات المتعلقة بتصنيع البروتين مخزنة في الجينوم (Genome) أو الجهاز الوراثي للخلية (DNA)، الذي ينتقل من الخلية إلى خلايا الأجيال التالية. كما أن الخلايا المتخصصة مثل الخلايا الكبدية (Hepatocyte) والعصبية (Neuron) والبنكرياسية (Pancreatic cell) تختلف في طبيعة البروتين المُصنَّع في كل منها، مع العلم أن هذه البروتينات تكون نفسها لكل نوع خلال الأجيال، ولكن تختلف بشكل واضح بين هذه الأنواع، أي التمايز الخلوي (Cellular differentiation) الناتج عن اختلاف التعبير الجيني للجينات.

الأحماض النووية Nucleic acids:

وهي خزين المعلومات الوراثية المُشفَّرة لتصنيع البروتينات، وحامل للمواد المنظمة والمسيطرة على هذه العمليات. ومن جانب آخر، تُعبّر البروتينات عن الصفات الوراثية، ولهذا فإن DNA يُنجز السيطرة الوراثية والهوية الذاتية من خلال البروتينات. ولكي يتم تصنيع البروتين في السيتوبلازم، فإنه لا بُدَّ من تصنيع نسخة رسولية كجزء من الـ DNA المطلوب لنقل السيتوبلازم، للسيطرة على، وتوجيه عملية تصنيع البروتين (mRNA).

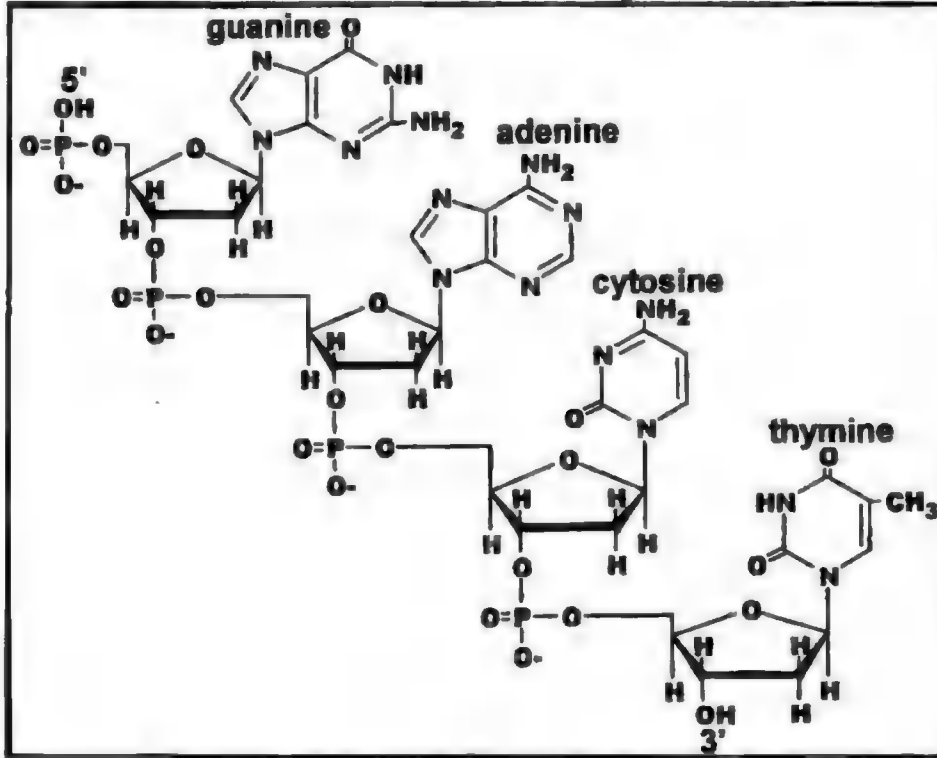
تركيب الـ DNA Structure of deoxyribonucleic acid (DNA):

وهو عبارة عن جزيئات ذات وزن جزيئي عالي، يتكوّن من آلاف الوحدات البنائية، تُسمّى نيوكليوتيدات (Nucleotides). وكل نيوكليوتيدة مُكوّنة من قاعدة نيتروجينية (Nitrogenous base)، وسكر خماسي (Pentose sugar)، وجزيئة حامض الفسفوريك (Phosphoric acid molecule).

القواعد النيتروجينية: وهي القواعد البيورينية (Purine bases)، التي تشمل الأدينين A (Adenine) والجوانين G (Guanine) والقواعد البايروميدينية (Pyrimidine bases)، التي تشمل السيتوسين C (Cytosine) واليوراسيل U (Uracil)، موجود في RNA فقط) والثايمين T (Thymine)، موجود في DNA فقط).

السكر الخماسي : وهو سكر الرايبوز (Ribose) في الـ RNA، وسكر الرايبوز منقوص الأوكسجين (Deoxyribose) في الـ DNA. والشكل (2 - 1) يوضح جزء من شريط DNA مُكوّن من جوانين، أدنين، سايتوسين، ثايمين. ويُبيّن الأصرة الفوسفاتية ثنائية الأستر (Phosphodiester bond) في عموده الفقري.

إن القواعد النيتروجينية ترتبط مع ذرة الكربون رقم 1 (C1) للسكر الخماسي، ويرتبط حامض الفسفوريك مع ذرة الكربون رقم 5 (C5) لهذا السكر، (شكل 2 - 1).



شكل (2 - 1). ارتباط النيوكليوتيدات مع بعضها ضمن شريط الـ DNA

ترتبط النيوكليوتيدات فيما بينها بواسطة الأصرة الفوسفاتية ثنائية الأستر، ولذلك فإن مجموعة الهيدروكسيل (OH) على ذرة الكربون 3 (C3) للسكر الخماسي في النيوكليوتيدة ترتبط مع مجموعة الهيدروكسيل على حامض الفسفوريك المرتبط مع ذرة الكربون 5 (C5) للسكر الخماسي للنيوكليوتيدة التالية. ولذلك فإن شريط الـ DNA أو

الـ RNA سوف يمتلك مجموعة فوسفات حرة عند مجموعة الهيدروكسيل لذرة الكربون رقم 5 للسكر الخماسي، أو عند نيوكليوتيدة نهايته القمية (Top end) (النهاية الطرفية اليسرى Left terminal)، أي بمعنى 5'-end. ومجموعة هيدروكسيل حرة في ذرة الكربون C3 للسكر الخماسي عند نيوكليوتيدة نهايته القاعدية (Bottom) (النهاية الطرفية اليمنى Right terminal)، أي بمعنى 3'-end. ولهذا فإن الحامض النووي يمتلك قطبية 5'-3'. والتسلسل المُشفر للنيوكليوتيدة يُقرأ بالاتجاه من 5' إلى 3' في الـ mRNA، والاتجاه 3' إلى 5' في الـ DNA.

بعض قياسات الـ DNA وأوزانه:

- وزن الزوج القاعدي AT = 617 دالتون.
- وزن الزوج القاعدي GC = 618 دالتون.
- وزن كيلو زوج قاعدي (kb 1) = 1000 bp = 617500 دالتون.
- $1 \text{ kb} = 1.026 \times 10^{-6} \text{ بيكوجرام (pg)}$. أي أنه $1 \text{ pg} = 10^6 \text{ kb}$.
- المسافة بين زوجين قاعديين متاليين = $3.4 \text{ \AA} = 0.34 \text{ nm}$.
- $1 \text{ kb} = 340 \text{ nm} = 0.34 \text{ \mu m}$.
- 1 \mu m من DNA مزدوج الأشرطة = 2.9 kb .
- قطر حلزون الـ DNA المزدوج = 20 \AA .

التركيب الأولي للـ DNA : Primary structure of DNA

يتواجد الـ DNA في النواة (Nucleus)، ويحتوي على السكر الخماسي منقوص الأوكسجين والأدينين والجوانين (قواعد بيورينية) والثايمين والسيتوسين (قواعد بايريميدينية)، إذ إن التركيب الأولي للـ DNA يمثل تسلسل خطي (Linear sequence) من الوحدات النيوكليوتيدية البنائية بالشكل الآتي:

Deoxy-adenylic acid (adenine-deoxyribose-phosphoric acid).

Deoxy-guanylic acid (guanine-deoxyribose-phosphoric acid).

Deoxy-cytidylic acid (cytosine-deoxyribose-phosphoric acid).

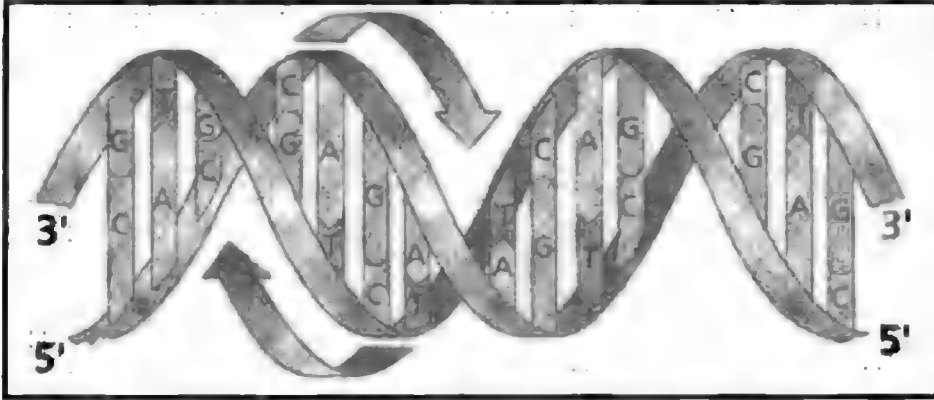
Deoxy-thymidylic acid (thymine-deoxyribose-phosphoric acid).

التركيب الثانوي للـ DNA Secondary structure of DNA

يتواجد الـ DNA بهيئة جزيئة مزدوجة الشريط (Double stranded molecule)، ويتكوّن كل شريط من جزيئة طويلة جداً تحتوي على آلاف النيوكليوتيدات. إن كلا الشريطين يكونان باتجاهين متوازيين متعاكسين (Anti-parallel)، أي أنه يكون اتجاه أحد الأشرطة $5' \leftarrow 3'$ (الشريط المُشَفَّر أو الحساس The coding or sense strand)، والشريط الآخر يكون باتجاه $3' \leftarrow 5'$ (الشريط غير الحساس أو غير المُشَفَّر أو القالب The antisense, non-coding or template strand). إن كلا الشريطين يكملان بعضهما البعض اعتماداً على أساس التزاوج القاعدي الذي يُشير إلى أن الأدينين يرتبط مع الثايمين بواسطة آصرتين هيدروجينيتين، ويرتبط الجوانين مع السايتوسين دائماً بواسطة ثلاث أواصر هيدروجينية.

إن نسبة البيورينات (G+A) إلى البايريميدينات (C+T) تساوي تقريباً 1، (شكل

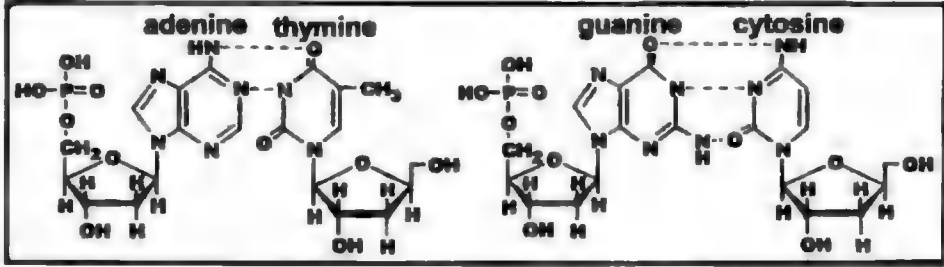
(2-2).



شكل (2-2). الحلزون المزدوج الأشرطة للـ DNA

تتلف جزيئة الـ DNA ذات الأشرطة المزدوجة لتكوّن هيئة حلزونية حول محور طولي مشترك، وهذا الترتيب يؤدي إلى تكوين نوعين من الأحاديد، وهي الأحاديد

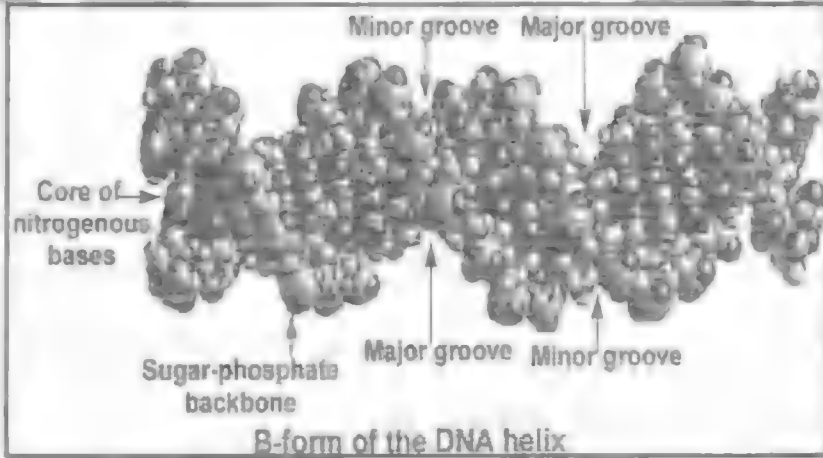
الكبرى والصغرى (The Major and the minor grooves)، وذلك لأن الفراغ الذي يُملأ بشناتيات الأدينين - ثايمين لا يُماثل ذلك الذي يُملأ بشناتيات الجوانين - سايتوسين، (شكل 2 - 3).



شكل (2 - 3). ارتباط القواعد النيتروجينية المتقابلة في شريطي DNA المتوازيين في تركيب DNA، يبرز السكر الخماسي منقوص الأوكسجين المُحب للماء، وحامض الفسفوريك باتجاه الخارج لتكوين العمود الفقري للجزيئة، في حين تُرص القواعد النيتروجينية الكارهة للماء في مركز الجزيئة لكي تكون قادرة على التقابل مع القواعد النيتروجينية في الشريط الآخر، وتسهيل ارتباطها مع بعضها البعض بواسطة الأواصر الهيدروجينية.

وطبقاً إلى التركيب الحلزوني (الذي يعتمد على تركيب القواعد والظروف الفيزيائية) يكون DNA بثلاثة أنواع:

1. شكل B-form: وهو حلزون يميني الدوران (Right-handed helix) ويُعدّ الشكل الأكثر شيوعاً، (شكل 2 - 4).



شكل (2 - 4). الشكل B (B-form) لـحلزون الـDNA

2. شكل A-form: وهو الشكل فاقد للماء من الشكل B تحت محتوى ملحي مُنخفض، وأقصر وأسمك مقارنةً بالشكل B، ويتملك ارتفاعاً قصيراً في لفاته (لفة: turn)، ولكنه لا يتواجد تحت الظروف الفسيولوجية.

3. شكل Z-form: وهو ذو شكل حلزوني زكزاكي يساري الدوران (Left-handed and zigzag-like helix)، وأنحف من الشكل B، الأمر الذي يؤدي إلى اختفاء الأخاديد الكبرى، وزيادة عمق الأخاديد الصغرى. وهو يتكوّن من الشكل B تحت ظروف التركيز العالي للأيونات الموجبة، وكذلك في المناطق الغنية بالـG والـC.

طبقاً إلى عدد الأشرطة يكون الـDNA إما مُفرد أو مُزدوج الشريط (Single or double stranded)، وكل منهما قد يكون حلقي أو خيطي مفتوح (Circular or opened linear):

1. الـDNA الخيطي مزدوج الشريط (Double stranded linear DNA): يتواجد في النواة للخلايا الجسمية (Somatic cells)، ويُشفّر إلى أغلب البروتينات الخلوية. وكذلك يتواجد في الـDNA الفيروسات.

2. الـDNA الحلقي مزدوج الشريط (Double stranded circular DNA): يتواجد في المايكوبلازما والمنطقة النووية للبكتريا والـDNA البلازميدي. إن الـDNA

المائتوكوندرية الحلقي الصغير يُشَقَّر إلى بعض بروتينات المائتوكوندرية، في حين أن الغالبية من بروتينات المائتوكوندرية يُشَقَّر لها من قبل DNA النواة. كذلك يتواجد هذا النوع في النباتات وبعض DNA الفيروسات.

3. الـ DNA الحلقي مفرد الشريط (Single stranded circular DNA): يتواجد في بعض الفيروسات الملتزمة للبكتيريا (Bacteriophages).

تركيب الأحماض النووية الرايبوزية

Structure of ribonucleic acid (RNAs)

يتواجد الـ RNA بشكل رئيسي في السائتوبلازم، وهو عبارة عن بوليمر لشريط مفرد من النيوكليوتيدات الرايبوزية (Ribonucleotides) من الأدينين والجوانين والسيتوسين واليوراسيل (بدلاً من الثايمين). وهو يحتوي على الرايبوز بدلاً من الرايبوز منقوص الأوكسجين. إذ يتواجد في النواة (Nucleus) والنوية (Nucleolus) والسائتوبلازم والمائتوكوندرية. وهو يكون بثلاثة أنواع، تختلف في المنشأ والوظيفة والحجم والتحوّل التركيبي وهي:

1. الـ RNA الرسول (mRNA) Messenger RNA:

إن النسخة الأولية الغير ناضجة من mRNA تدعى RNA النووي التباين hnRNA (Heterogenous nuclear RNA)، وبعد المعاملات، يكون على شكل جزيئة من شريط مفرد تتباين في الحجم من 400 - 4000 نيوكليوتيدة. وهو يتميز في حقيقيات النواة (Eukaryotes) بحدوث تحويرات كثيرة بعد عملية الاستنساخ (Post-transcriptional modification). إذ إن أول هذه التحويرات هي إزالة التسلسلات الداخلية الغير قابلة للترجمة والغير وظيفية (Non-functional untranslatable internal sequences)، أي الإنترونات (Introns). ثم يُضاف الذيل مُتعدد الأدينين (polyadenylate tail) بحدود 250 - 20 قاعدة عند النهاية 3' (3'-end) الذي يعلم الـ mRNA للاستنساخ في السائتوبلازم ويحميه أيضاً من التحلل بفعل إنزيم 3'-exonuclease كما وتضاف الفلنسة (-7-methyl-guanosine triphosphate cap) عند النهاية 5' (5'-end) للـ mRNA. إن هذه الفلنسة توجّه عملية بدء الترجمة، وتحمي الـ mRNA من التحلل بفعل إنزيم 5'-exonuclease. كما

ويحتوي كذلك على مناطق لا تترجم عند الأطراف 5' و 3' (5' and 3' terminal untranslated regions) تتضمن تسلسل تنظيمي (Regulatory sequence) للترجمة وللعمر النصفى للمRNA، (شكل 2-5).

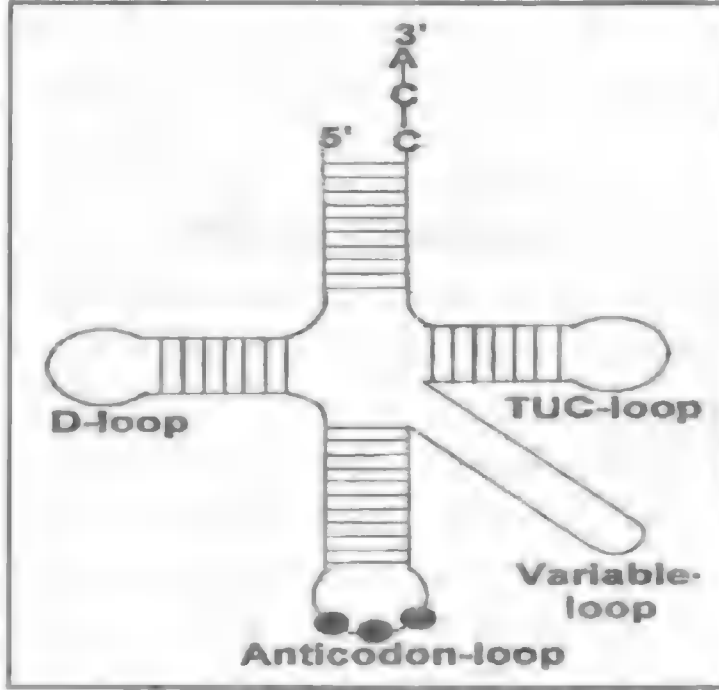


شكل (2-5). mRNA الناضج بعد إجراء التحويرات عليه

يتم نسخ mRNA في النواة من خلال استنساخ تسلسل من DNA لجين مُعَيَّن على أساس التكامل القاعدي (Base complementary rule)، وباستخدام الشريط ضد الحساس (Antisense strand) للـ DNA كقالب. يحمل mRNA المعلومات الوراثية (الشفرات Codons) لتصنيع البروتين، إذ إن كل حامض أميني يتم تمثيله بوساطة تسلسل من ثلاث نيوكليوتيدات، أي أن الشفرة يتم تمييزها من خلال الشفرة المضادة (Anticodon) الواقعة على الـ tRNA.

2. الـ tRNA الناقل (tRNA): Transfer RNA

يُعدّ الـ tRNA من أبسط واصغر أنواع الـ tRNA، وهو يتكوّن من 73 - 93 نيوكليوتيدة طويلاً، ويُشبه الـ mRNA في كونه يستنسخ من جينات خاصة، ويحتاج إلى معاملات بعد استنساخه لإزالة الانترونات، وتعرض كذلك قواعده إلى تحويرات كبيرة، إذ يُضاف التسلسل 3'-ACC المستقبل للحامض الأميني (3'-ACC amino acid acceptor sequence) بعد الاستنساخ. ويتميّز بوجود الأواصر الهيدروجينية بين بعض التسلسلات التي تُعطيه الشكل الشبيه بورقة البرسيم (Clover leaf like shape)، ذو ثلاث عروات Three loops (عروات أو أذرع)، مع عروة إضافية (Extra loop) وطرفين حرّين يتمثّلان بالنهاية 3'-end والبداءة 5'-end. يحمل الـ tRNA الأحماض الأمينية التي ترتبط مع النهاية 3' وينقلها إلى الرايبوسومات لتصنيع البروتين، ولهذا فإن لكل حامض أميني tRNA خاص بنقله، بمعنى وجود 20 نوع من الـ tRNA، (شكل 2-6).

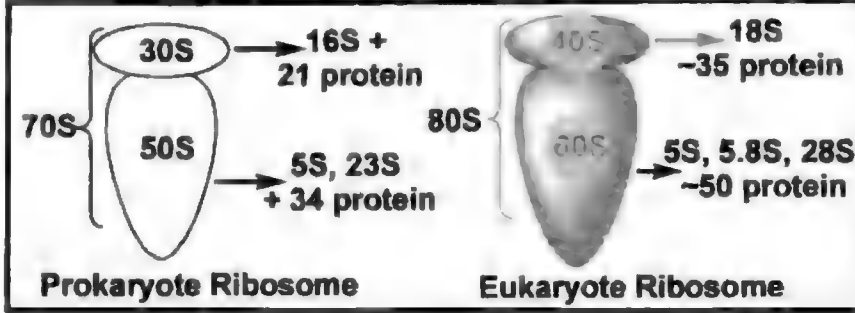


شكل (2 - 6). موديل tRNA الشبيه بورقة البرسيم

3. RNA الرايبوسومي (rRNA): Ribosomal RNA

تتجمع أنواع rRNA مع بعض البروتينات لتكوين الرايبوسومات التي تمثل موقع تصنيع البروتين، ويُصنّف طبقاً لمعدل طوفانه خلال عملية الطرد المركزي في محلول NaCl بوحدة سفديرك (Svedberg units)، أي إلى 5S و 16S و 23S و 5S في بدائيات النواة (Prokaryotes) والمائتوكوندرية، وإلى 5S و 18S و 28S و 5.8S و 5S في حقيقيات النواة (Eukaryotes) والتي تتكوّن من 120 و 160 و 1900 و 4700 نيوكليوتيدة طولاً على التوالي. ففي حقيقيات النواة تكون الرايبوسومة 80S بالحجم، والتي تتشكل من وحدتين ثانويتين (Two subunits): 60S و 40S، إذ تتكوّن الوحدة الثانوية 60S من ما يقارب 50 جزيئة بروتينية، و rRNA من الأنواع 5S و 5.8S و 28S. أما الوحدة الثانوية 40S فهي تتكوّن من ما يقارب 35 جزيئة بروتينية، و rRNA من النوع 18S. وفي بدائيات النواة تكون الرايبوسومة 70S بالحجم وتتشكل من وحدتين ثانويتين: 50S و 30S، إذ تتكوّن الوحدة الثانوية 50S من ما يقارب 34 جزيئة

بروتينية، و rRNA من الأنواع 23S و 5S. أما الوحدة الثانوية 30S فتتكون من ما يقارب 21 بروتين و rRNA من النوع 16S، (شكل 2 - 7).



شكل (2 - 7). رايبوسومات بدائية وحقيقية النواة

تنظيم الكروماتين Chromatin organization:

إن المحتوى الكلي من Protein / RNA / DNA في النواة يدعى بالكروماتين، ويدعى جزء الـ DNA منه بالجينوم (Genome). كما أن طول الـ DNA النووي البشري أحادي المجموعة الكروموسومية (Haploid human nuclear DNA) هو بحدود 1 متر (3×10^9 زوج قاعدي bp)، في حين أن قطر الخلية الكلي هو 20 ميكرومتر، وقطر النواة 5 - 10 ميكرومتر. تتغير نواة الخلية في بعض الاعتبارات اعتماداً على نوع الخلية والفعالية، أي قد تكون صغيرة أو متوسطة أو كبيرة بالحجم، أو مركزية أو طرفية أو محيطية أو عند القاعدة في الموقع، مستديرة أو قضيبية أو كلوية أو مسطحة بيضوية أو فصيّة في الشكل. والخلية قد تكون أحادية النواة (أغلب خلايا الجسم)، أو ثنائية النواة (مثل الخلايا البارنكيميّة للكبد)، أو عديدة الأنوية (مثل الخلايا العضلية الهيكلية). لذلك فإن الـ DNA يتكتف ليحتل حيز صغير، وهذا التكتف يحتاج إلى أسلوب تنظيمي جيد لكي يسهل التعامل معه خلال عمليتي الاستنساخ والتضاعف. إن تركيب الجينوم في هذه الهيئة التنظيمية يُدعى بالكروماتين، وهذا التنظيم يتطلب التداخل مع بعض البروتينات و الـ RNA. وعليه يتكوّن الكروماتين من شريط مزدوج من الـ DNA والهستونات Histons (بروتينات قاعدية Basic proteins)، وبروتينات

غير هستونية (بروتينات قاعدية أخرى مثل البروتامينات Protamines)، وكمية صغيرة من الـ RNA.

الهستونات هي بروتينات قاعدية غنية جداً باللايسين والأرجينين، ولذلك فهي ذات شحنة موجبة، وترتبط مع جزيئات الـ DNA ذات الشحنة السالبة بالأواصر الأيونية (Ionic bonds)، وتكون الهستونات على خمسة أنواع، وهي H1, H2A, H2B, H3, H4.

أما بالنسبة لللاهستونات (Nonhistons)، فتوجد هذه البروتينات سويةً مع الـ DNA، ويصعب عزلها، وتضم ما لا يقل عن 20 نوعاً رئيسياً، فضلاً عن مئات الأنواع من البروتينات الثانوية. تكون اللاهستونات حامضية المحيط، واسعة الانتشار، ولكن نسبتها إلى DNA الكروماتين متغيرة وغير ثابتة. وعلى العموم فإن الخلايا الحاوية على العديد من الجينات الفعالة بعمليات الاستنساخ تكون متميزة باحتوائها على نسب أكبر من البروتينات اللاهستونية. تُعدّ عملية تغيير اللاهستونات عملية مُنظمة وذات آلية أكثر تخصصاً في السيطرة على جينات مُعيّنة، أي أن لها دوراً تركيبياً في تنظيم الكروموسوم. كما يتم بناء هذا النوع من البروتينات خلال دورة حياة الخلية.

النيوكليوسوم Nucleosome:

إن الوحدة الترميزية (Packing unit) للكروماتين تُدعى بالنيوكليوسوم، إذ يتكوّن النيوكليوسوم من مركز هستوني (Histone core) مُكوّن من ثمان جزيئات هستونية: اثنتان H2A، اثنتان H2B، اثنتان H3، اثنتان H4. ويلتف على سطح النيوكليوسوم ما يقارب 1.75 لفة من الـ DNA (146 نيوكليوتيدة طويلاً). وهناك DNA رابط (30 نيوكليوتيدة طويلاً) يشدّ بين المراكز النيوكليوسومية، تتخلله جزيئة واحدة من الهستون H1، إذ يتم من خلال ذلك لفتين من الـ DNA.

لا تقوم الهستونات بدور تركيبى غير فعال فقط، ولكن لها دوراً تنظيمياً أيضاً حيثما توجد للقيام بالتحويل التساهمي، مثل عمليات الأستلة (Acetylation)، والفسفرة (Phosphorylation) للقيام بتسريع أو إبطاء معدل الاستنساخ، وهذا يؤثر أيضاً على تكشف الكروموسومات خلال التضاعف، وعملية الـ ADP-ribosylation خلال إصلاح الـ DNA (DNA repair).

لذلك فإن تنظيم الشريط المزدوج للـ DNA في النيوكليوسومات يجعله يبدو شبيهاً بالخرزات في المسبحة، على شكل ليف قطره 10 نانومتر. وهذا الليف يلتف مرة أخرى حول محور مجوف خيطي على شكل حلزون مكون من 6 - 7 نيوكليوسومات لكل لفة، ليكون ليف قطره 30 نانومتر. ويتنظم هذا الأخير في عروات (Loops) أو قباب (Domains) بواسطة منصات بروتينية في كروموسوم الطور البيني الممتد، وكل منها يتضمن 30000 - 100000 نيوكليوتيدة، والتي تُشكل جزر وراثية مفصولة بسمك 30 نانومتر.

عندما تقترب الخلية من الدخول في الانقسام (Mitosis)، فإن الكروماتين يتكثف أكثر بطول 100 ضعف حتى يبدو بهيئة كروموسوم انقسامي يُميز بسمك 1400 نانومتر. إن الكروماتين ذو النشاط الاستنساخي، حيث تكون جيناته فعالة، يُدعى بالكروماتين الحقيقي (Euchromatin)، ويصطبغ بلون باهت عند تصيغه بالصبغات القاعدية (Basic dyes)، ويكون غير مُتكثف، ويُشكل الغالبية من الكروماتين المُلاحظ في نوى الطور البيني، ويكون مُتشرراً في النواة ولا يمكن ملاحظته بالمجهر الضوئي. ولكن الكروماتين الذي يصطبغ بلون غامق بالصبغات القاعدية يُدعى الكروماتين المتباين (Heterochromatin)، ويشتمل على مناطق كروموسومية تبقى مُتكثفة خلال الطور البيني. يُعتبر الـ DNA في الكروماتين المتباين غير نشط (خامل وراثياً)، ويكون موقعه إما مُترافقاً مع الغلاف النووي، ويسمى بالكروماتين المحيطي (Peripheral chromatin)، أو حول النوية ويسمى الكروماتين المرافق للنوية (Nucleolus-associated chromatin)، أو مُتشرراً بشكل حُبيبات كروماتينية في حشوة النواة ويسمى جزر الكروماتين (Chromatin islands). ويمثل الكروماتين المتباين الحُرْم الغير فعالة المُتكثفة من الكروموسومات، وكذلك يُشكل الذراع p في الكروموسومات شبه طرفية السنتروميير (Acrocentric chromosomes)، إذ إن فقدانه لا يؤدي إلى تأثيرات مُضرة في انتقال Robertsonian translocation المتوازن. ويتضاعف في مراحل متأخرة من دورة الخلية، ويُقسم إلى نوعين:

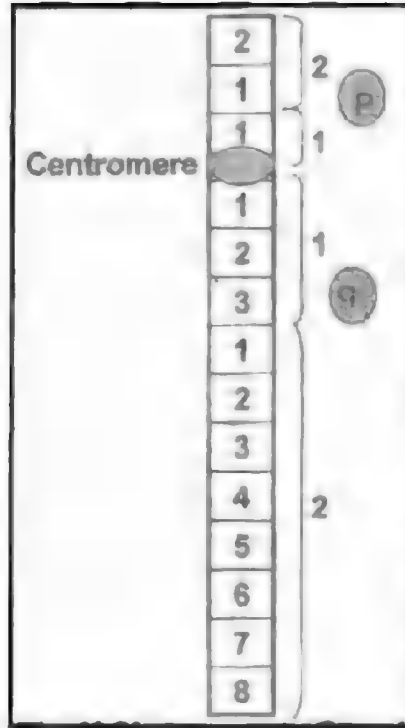
أ. الكروماتين المتباين الاختياري Facultative heterochromatin.

ب. الكروماتين المتباين التكويني Constitutive heterochromatin.

يختلف الكروماتين المتباين الاختياري من نسيج إلى آخر، ويمثل المناطق الكروموسومية التي تكون خاملة في بعض أنواع الخلايا، كما أن كمية هذا الكروماتين تكون قليلة جداً في الخلايا الجنينية، ويمكن أن يكون بكميات وفيرة في الخلايا المتمايزة، ولذلك يُعدّ وسيلة مهمة في غلق المعلومات الوراثية خلال التمايز أو التطور.

أما بالنسبة للكروماتين المتباين التكويني، فإن يمثل المناطق الكروموسومية الغالبة من الكروماتين المتكثف، لذلك يكون حامل وراثياً في جميع الخلايا، وفي الإنسان يتمثل في مناطق الـ DNA الموجودة في السنترومير (Centromer أو يُسمى Kinetochores) وهي المنطقة التي من خلالها يرتبط كروماتيدي الكروموسوم مع بعضهما، وكذلك يرتبط بوساطتها الكروموسوم مع خيوط المغزل أثناء الانقسام. إن النمط الكروماتيني يُعدّ دليلاً لفعالية الخلية، إذ إن الخلايا ذات النوى الباهتة تُعدّ أكثر فعالية في تصنيع البروتين مقارنةً بالنوى الداكنة.

في الجمينات (البويض والحيوانات المنوية) يكون الجينوم في هيئة كروموسومية أحادية (Haploid)، ويحدود 3×10^9 زوج قاعدي، وهو نصف العدد مقارنةً بالخلايا الجسمية. لذلك فالجمينات البشرية تحتوي على 22 كروموسوم جسمي (22 Autosomal chromosomes)، وكروموسوم جنسي واحد (One sex chromosome)، بحيث يكون X في الجمينة الأنثوية، و Y في الجمينة الذكورية. إن كل كروموسوم في الطور الاستوائي مُكوّن من كروماتيدتين مرتبطتين بواسطة السنترومير، إذ يتكوّن الكروماتيد من جزيئة واحدة من DNA مزدوج الشريط بحدود 1.3×10^8 نيوكليوتيدة، ويمتلك ذراعين، القصير (Petit = p) والطويل (Grand = g = q). وكل من هذين الذراعين يُقسم إلى مناطق regions (1، 2، ...) والتي تُقسم إلى حُزم bands (1، 2، 3، 4، ...) ابتداءً من السنترومير، انظر الشكل (2-8) الخاص بالكروموسوم X.



شكل (2 - 8). تركيب الكروموسوم X

في الخلايا الجسمية يكون الجينوم ثنائي المجموعة الكروموسومية (Diploid) ضعف عدد الكروموسومات الموجودة في الجميتات)، ولذلك فإن كل خلية جسمية بشرية تحتوي على 22 زوج من الكروموسومات الجسمية المتناظرة (Homologous autosomal chromosomes)، وكروموسومين جنسين، وهما XX في الخلايا الأنثوية، أو XY في الخلايا الذكرية.

هنالك ما يقارب 10^5 جين (ما يقارب 100000 بيتيد متعدد) في كل خلية، والتي تُشكل فقط 10% من تسلسلات الـ DNA الكلي، والمتبقي من الـ DNA (90%) والذي يُمثل تسلسلات من الـ DNA موجودة في الجين ذات أهمية في إنجاز وظائف تنظيمية، وتحتوي خلايا الكبد والكلية على 10000 - 15000 بروتين فقط، بسبب التعبير الخاص بالنسيج (Tissue-specific expression) للجينات.

النواة Nucleus:

تُحاط النواة بغلاف نووي ثنائي الأغشية، بحيث يكون الغشاء الخارجي مستمر مع الشبكة الأندوبلازمية، في حين أن الغشاء الداخلي يُسند بواسطة صفيحة ليفية (Fibrous lamina). يتخلل الغلاف ثقبوب تسمح بتبادل الجزيئات الكيميائية مع السايوبلازم. كما تحتوي النواة على سائل يسمى Karyoplasm يحتوي على بروتينات وأيونات ومواد أيضية ودهون وجزيئات RNA صغيرة.

تحتوي الخلايا الجسمية الأنثوية في الطور البيني على كروماتين يصطبغ بكثافة بهيئة كتلة مُتميزة بالقرب من الغلاف النووي، وهو كروموسوم X غير نشط، إذ يكون مُتراصاً بسبب تضاعفه المُتأخر، مقارنةً بالكروموسومات الأخرى، ويبقى مُتكاثفاً إلى وقت مُتأخر مقارنةً ببقية الكروموسومات، ويُدعى كروماتين X (X chromatin) أو جسم بار (Bar body).

النوية Nucleolus:

وهي منطقة تتواجد في النواة، لا تُحاط بغشاء، وتصطبغ بشدة بسبب توافر حدودها مع الكروماتين المتباين، تتمثل بتركيب كروي، وتُلاحظ فقط في نوى الطور البيني (Interphase nucleus). تصطبغ النوية بالصبغات القاعدية بسبب وفرة ال-rRNA والبروتينات فيها، كما أنها تحتوي على كميات قليلة من ال-DNA غير النشط، وكل ذلك تحتوي على تسلسلات تابعة (Satellite sequences) للكروموسومات 13، 14، 15، 21، 22، تتضمن جينات مُشفرة لل-rRNA. هذا وتُعد النوية المكان الذي يُستنسخ منه ال-rRNA، والتجميع المبني للجسيمات الرايوسومية. كما أن الخلية قد تحتوي على واحد أو أكثر من النويات، وخصوصاً تلك التي تكون نشيطة في تصنيع البروتين، مثل الخلايا الغنية البنكرياسية (Pancreatic acinar cells).

تتكون النوية من ثلاثة مناطق مُتميزة، وهي:

1. منطقة Pars granulosa: تتشكل من حبيبات كثيفة إلكترونياً (Electron dense granules)، تمثل تراكم من rRNA مع بروتين رايبونوكليوتيدي.

2. منطقة Pars fibrosa: تتشكل من خويطات مُرَزَّمة بقوة دقيقة كثيفة إلكترونياً (Electron dense fine tightly packed filaments)، والتي تمثل rRNA مُستنسخ حديثاً.

3. مناطق تنظيم النوية NORs (Nucleolar organizer regions): وهي مناطق مستديرة ذات كثافة منخفضة، تمتلك جينات خاصة نوبوية (Nucleolar genes)، إذ إن هناك خمسة أزواج من الكروموسومات تحتوي على مناطق تنظيم نوبوية NORs، حيث المواقع الجينية (Gene loci) المُشَفَّرة للـ rRNA، والتي تقع على الكروموسومات رقم 13، 14، 15، 21، 22 المُشار إليها أعلاه.

الحشوة النووية Nuclear matrix:

وهي المكوّن الذي يملأ الفراغ بين الكروماتين والنوية، وتتكون من بروتين و RNA و بعض الـ DNA. ها وتشارك الحشوة في عملية الاستنساخ الجيني، وكذلك تجهّز مواقع التكرار (Replication sites) لعملية تضاعف الـ DNA (Duplication) الكروموسومي.

وظائف النواة Function of the Nucleus:

يمكن تلخيص أهم وظائف النواة بالآتي:

1. توجيه عملية الانقسام الخلوي (Cell division).
2. حمل المعلومات والصفات الوراثية للكائن الحي.
3. توجيه عمليات تصنيع البروتين والفعاليات الأخرى للخلية.
4. تكوين الـ RNA.

DNA الميتوكوندريا Mitochondrial DNA:

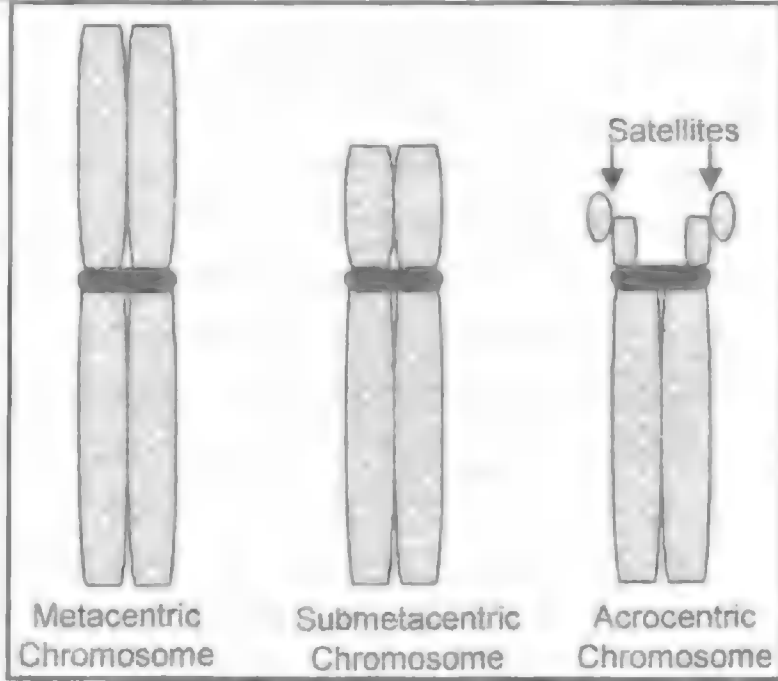
وهو عبارة عن DNA مزدوج الشريط دائري (Circular double stranded DNA)، بحدود 16 كيلو زوج قاعدي طويلاً، وبوجود اختلافات قليلة عن DNA النواة بخصوص معنى الشفرات الوراثية، وهو يُشَفَّر إلى نوعين من rRNA و 22 tRNA، ووحدات ثانوية

بروتينية لأربعة إنزيمات تشارك في إنتاج الطاقة. وطالما أن أغلب المايٹوكوندريا في الزايجوت (Zygote) تأتي من البيضة (مئات الآلاف)، مقارنةً بالحيوانات المنوية (بضع مئات)، فإن الطفرات في تلك الإنزيمات سوف تتخذ نمطاً أمومياً (Maternal pattern) للتوريث غير المتكافئ للأمراض المايٹوكوندريية. ومن الأمثلة على مثل هذه الأمراض MELAS (Myopathy: الاعتلال العضلي، Encephalopathy: اعتلال الدماغ، Lactic acidosis: حموضة اللاكتيك، Stroke-like episodes: العوارض الشبيهة بالسكتة)، وهي أمراض وراثية أمومية، بسبب نقص مُعقد I و IV.

إن هذا الـ DNA يتضاعف بنفسه خلال الطور G1 من دورة الخلية.

كروموسومات الطور الاستوائي Metaphase chromosomes:

وهي تتكوّن من DNA فائق الالتفاف (Super-coiled DNA) بحيث يتم هذا الالتفاف بمساعدة بروتينات مُنظمة، إذ تُصنّف هذه الكروموسومات حسب طولها الكلي وموقع السنترومير ونمط التخريم. فقد تكون وسطية السنترومير (Metacentric chromosome)، أو شبه طرفية السنترومير (Acrocentric chromosome)، التي قد تمتلك أحياناً بروز يُشبه العصي (Stick-like antenna) يُسمّى التابع (Satellite) يحتوي على التسلسلات المُشفرة للـ rRNA، وهي تكون مُنظّم DNA النوية (Nucleolus DNA organizer)، الذي يُلاحظ في الطور البيني Interphase. أو تكون بينية السنترومير (Intermediate chromosome)، أو ما يُطلق عليها بالكروموسومات شبه وسطية السنترومير (Submetacentric chromosome)، (شكل 2 - 9).



شكل (2 - 9). تصنيف الكروموسومات حسب موقع السنترومير

هذا مع العلم أن بعض المصادر العلمية تُشير إلى أن تصنيف الكروموسومات يكون على أربعة أصناف بدلاً من ثلاثة ، وهي كما يأتي:

1. كروموسوم وسطي السنترومير (وسطي التمرکز Metacentric): وهو الكروموسوم الذي له ذراعان متساويان بالطول، وتكون القطعة المركزية (السنترومير) قرب وسط الكروموسوم الذي يظهر على شكل حرف V باللغة الإنجليزية أثناء طور الانفصال.

2. كروموسوم شبه وسطي السنترومير (تحت وسطي Submetacentric): وهو الكروموسوم الذي له ذراعان غير متساويان بالطول، ويظهر بشكل حرف L باللغة الإنجليزية أثناء طور الانفصال.

3. كروموسوم شبه طرفي السنترومير (Acrocentric أو Subtelocentric): ويتبع عندما تقع السنترومير قرب إحدى نهايتي الكروموسوم مُكوّنة ذراعاً طويلاً نسبياً وآخر قصير جداً، ويأخذ هذا الكروموسوم شكل العصا بنهاية قصيرة ملتوية 1.

4. كروموسوم طرفي السنتروميير (Telocentric): وفيه تحتل السنتروميير نهاية الكروموسوم الذي يأخذ شكل العصا عند طور الانفصال.

وفي الحقيقة يوجد شك كبير في إمكانية وجود سنتروميير طرفية بالمرّة في الطبيعة في أي كائن حي تحت الظروف الطبيعية، إذ إن ذلك يعني أن السنتروميير قد تقوم في هذه الحالة بوظيفة التيلوميير، وهذا أمر مُستبعد. ربما يكون أقرب مثال إلى ذلك ما وجد في أحد الأوليات Protozoa من الفصيلة Barbulanympha، إذ لوحظ أن الكروموسومات فيها تكون مُلتصقة بصفة دائمة بالغشاء الداخلي للغلاف النووي، وتكون طرفية السنتروميير. وقد يُفسّر هذا الالتصاق على أنه طريقة لإعطاء درجة من الثبات لبعض عناصر الكروموسومات غير المُستقرّة.

لقد أمكن الحصول على كروموسومات طرفية السنتروميير صناعياً بإحداث كسر في منطقة السنتروميير نفسها، ولكن عادةً ما تكون تلك الكروموسومات غير مستقرّة، ومن الصعب بقائها واستمرارها في الجينوم.

وقد يحتوي الكروموسوم في بعض الأحيان غير الطبيعية على سنترومييرين، فيقال له ثنائي السنتروميير (Dicentric) والذي يؤدي في العادة إلى شذوذ في حركة الكروموسوم، وتكوين جسر كروماتيدية.

وبخصوص الإنسان وجد أن الكروموسومات 1، 2، 16، 19، 20، تكون وسطية السنتروميير، بينما تكون الكروموسومات 13، 14، 15، 21، 22 وكذلك كروموسوم Y شبه طرفية السنتروميير، وتكون بقية الكروموسومات شبه وسطية، ولم يُلاحظ وجود كروموسومات طرفية في الإنسان إطلاقاً.

مفهوم الجين Gene concept

الجين (تسلسل من الـ DNA) هو جزء من الجينوم، يُشفر إلى RNA خاص (mRNA ، tRNA ، rRNA ، snRNA). إن هذا التسلسل من الـ DNA يتضمّن أساس الجين (Gene proper) الذي يستنسخ بالضبط إلى RNA والتسلسلات المنظّمة. يُشفر mRNA إلى سلسلة متعدد الببتيد أو إلى جزء من متعدد الببتيد، في حين يقوم كل من tRNA و rRNA بوظيفتهما المناسبة في تصنيع البروتين.

إن كل جين يحتل موقع معروف جيداً على الكروموسوم، أي ما يُسمى بموقع الجين (Gene locus). إذ يُشار إلى أليلات (Alleles) الجين على أنها زوج أو سلسلة من الجينات ذات العلاقة التي تحتل الموقع نفسه على الكروموسومات المتناظرة. وهذه الأليلات قد تكون متشابهة (Homozygous) أو قد تكون مختلفة (Heterozygous). هذا ويحدّد فعل الجين التركيب الوراثي (الطراز الوراثي Genotype)، أي كون تلك الأليلات مُتنحية أو تراكمية أو مُساندة أو سائدة. وفي التوريث السائد يكون أحد الأليلات سائداً Dominant، أي يُعبّر عن تأثيره في الطراز المظهري (Phenotype)، والأليل الآخر يكون مُتنحياً Recessive (غير فعال ولن يشارك في الطراز المظهري).

إن رحمة الخالق عزّ وجل جعلت من التوريث الجيني المُسيطر على الأمراض الوراثية يتم بأسلوب مُتنحي. وهذا يعني بأن كل من أليلي الجين (أو الأليلات الأخرى لهذا الجين) يجب أن يكونا حاملين للخلل لظهور المرض.

في الذكور لا تمتلك الجينات الموجودة على الكروموسوم الجنسي X نسخ (أليلات) على الكروموسوم الجنسي الذكري Y، ولذلك في الأمراض الوراثية المرتبطة بالجنس (Sex-linked inherited diseases) تكون الإناث عادةً حاملة (Carriers) للمرض، في حين يكون للذكور فرصة أكثر للإصابة، لامتلاكهم أليل واحد فقط.

تضاعف الـ DNA (تصنيع الـ DNA)

DNA Replication (DNA synthesis)

التضاعف هو تكرار محتوى الـ DNA قبل الانقسام، أي أن نسختي الـ DNA المتكوّنة تنقسم بشكل متساوي بين الخليتين البنويتين الجديدتين، إذ إن كل شريط قديم سوف يُطبع عليه شريط جديد مُتمم، ولذلك فالتضاعف يكون بأسلوب شبه محافظ (Semi-conservative) في طبيعته، والذي يعني بأن كل خلية بنوية سوف تستقبل شريط DNA من الخلية الأمية، وشريط مُتمم مُصنّع حديثاً. وهذا يقع في سياق ما تم توقّعه من قبل العالمان Watson و Crick (1953)، وحسب الآتي:

إن الموديل الحالي للـDNA يُبين احتوائه على زوج من القوالب، كل واحد منهما يكون مُتمماً للآخر، وعليه يمكن تخيل كون الفترة قبيل التضاعف تتضمن تكسر الأواصر الهيدروجينية، وحدوث انفلال للسلسلتين وانفصالهما عن بعضهما البعض، ثم تعمل كل سلسلة كقالب لتكوين سلسلة مرافقة جديدة، وفي النهاية يجب أن نحصل على زوجين من السلاسل، في حين الموجود سابقاً فقط زوج واحد. علاوةً على ذلك، فإن التسلسل لأزواج القواعد سوف يتضاعف بشكل دقيق.

الإنزيمات المشاركة في تضاعف الـDNA

Enzymes participating in DNA replication

في بدايات النواة، فضلاً عن الإنزيمات التالية، لا بُد من وجود 10 بروتينات إضافية، مثل البروتينات المرتبطة بالـDNA مفرد الشريط (SSBPs Single stranded DNA binding proteins)، والتي تمنع عودة التفاف حلزون الـDNA من خلال ربط الشريط المفرد للـDNA المتكوّن بفعل إنزيم الـHelicase بدون التداخل مع وظيفة إنزيم الـDNA polymerase.

أ. إنزيم الـDNA polymerase I: ويكون مسؤولاً عن ملء الشغرات من خلال ترجمة الشغرات الناتجة من إزالة بوادئ الـRNA (RNA primers) المستخدمة خلال تضاعف الـDNA في سلسلة الـDNA.

ب. إنزيم الـDNA polymerase II: يمتلك وظيفة كمصحح للبروفات التضاعفية، فضلاً عن وظيفته الإصلاحية للـDNA (DNA repair).

ج. إنزيم الـDNA polymerase III: وهو الإنزيم الرئيس المسؤول عن تضاعف الـDNA.

د. إنزيم الـDNA helicase: يعمل على قل الحلزون المزدوج للـDNA إلى شريطين مفردين، إذ يعمل على تكسير الأواصر الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية وبالاكتفاء على طاقة الـATP، إذ يتم استهلاك جزيئين من الـATP لكسر كل زوج قاعدي. وحال الانفصال وتكوين الأشرطة المفردة، فإنه يتم المحافظة على

استقراريتها بواسطة بروتينات تُسمى البروتينات الرابطة للـ DNA (DNA-binding proteins).

هـ. إنزيم الـ Primase: وهو إنزيم بلمرة للـ RNA يعتمد على الـ DNA (DNA-Primase) والذي يعمل على تصنيع بوادئ RNA قصيرة (Short RNA primers) بحدود 5 - 200 قاعدة وبمساعدة البروتين الرابط للـ DNA المُسمى (Primosome). إن بادئ الـ RNA يكون مُتمماً ومُعاكساً في الاتجاه للـ DNA الذي يعمل الـ Primase على استخدامه في التصنيع. يتطلب إنزيم الـ DNA polymerase III يتطلب البادئ للاستمرار عند بداية عملية التضاعف، إذ يمتلك البادئ على نهاية OH - 3' حرة تستقبل النيوكليوتيدات الرايوزية منقوصة الأوكسجين التي تُضاف من قبل إنزيم الـ DNA polymerase III.

و. إنزيم الـ DNA gyrase: يعمل على إزالة الالتفافات الفائقة الموجبة (Positive supercoils)، وإدخال اللف الفائق السلبي.

ز. إنزيم الـ DNA ligase: ويعمل على ربط (لصق) النهاية OH - 3' الواقعة عند ذرة الكربون C3 عند إحدى النهايات مع النهاية OH - 5' الفوسفاتية الأخرى للـ DNA عند ذرة الكربون C5.

في حقيقيات النواة In eukaryotes:

إن إنزيمات بلمرة الـ DNA في اللبائن تتمثل بالأنواع الخمسة التالية: DNA polymerase $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ ، إذ يعمل إنزيم DNA polymerase δ على إنجاز وظيفة الـ DNA polymerase III. أما إنزيم DNA polymerase α فيعمل على إنجاز وظيفة إنزيم الـ DNA polymerase I. ويُشابه الـ DNA polymerase ϵ إنزيم الـ DNA polymerase II من حيث وظائفه التصحيحية للبروفات التضاعفية والإصلاحية. كما ويمتلك إنزيم الـ DNA polymerase β وظيفة إصلاحية. وفيما يتعلق بإنزيم الـ DNA polymerase γ فهو إنزيم بلمرة للـ DNA في المايكوندريا (جدول 2 - 1).

جدول (2 - 1). مقارنة لأنواع ووظائف الإنزيمات المشتركة في تضاعف الـ DNA في بدائيات وحقيقيات النواة

الوظيفة	بدائيات النواة	حقيقيات النواة
ترجمة الشفرة في الـ DNA والإصلاح (DNA nick translation and repair)	Polymerase I	Polymerase α
تضاعف الـ DNA (DNA replication)	Polymerase III (+) تصحيح البروفات (التضاعفية Proofreading)	Polymerase δ
تصحيح البروفات التضاعفية والإصلاح (DNA proofreading and repair)	Polymerase II	Polymerase ϵ
إصلاح الـ DNA (DNA repair)	-	Polymerase β
تضاعف الـ DNA المايكوندريا (Mitochondrial DNA replication)	-	Polymerase γ

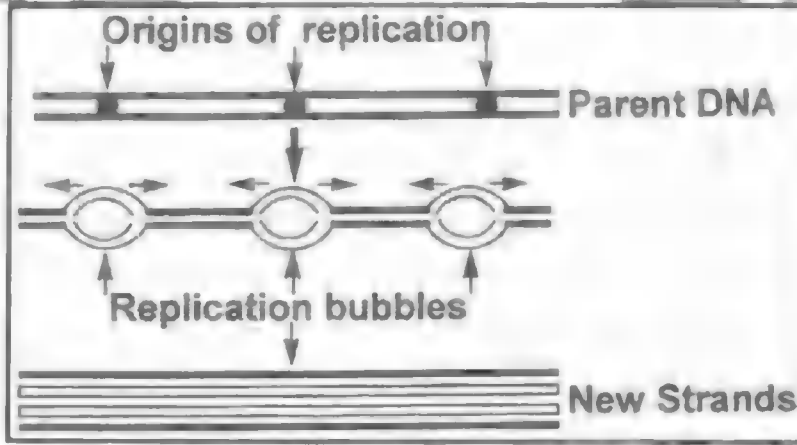
مواقع تضاعف الـ DNA Sites of DNA replication

في بدائيات النواة:

يكون فيها شريط الـ DNA بطول محدود، ولذلك يبدأ التضاعف في موقع مفرد عنده يتم انفصال شريطي الـ DNA عن بعضهما، ويسمى هذا الموقع بأصل التضاعف Origin of replication (OriC)، إذ يمتلك هذا الموقع تسلسل نيوكليوتيدي خاص يتم تمييزه بواسطة الإنزيمات والبروتينات المسؤولة عن بدء تضاعف الـ DNA.

في حقيقيات النواة:

يحدث التضاعف في مواقع تضاعف متعددة بشكل متزامن، إذ تنفصل الأشرطة المزدوجة عن بعضها، لضمان تضاعف سريع في شريط الـ DNA الطويل في هذه الكائنات (شكل 2 - 10).



شكل (2 - 10). مواقع أصل التضاعف التي تتوسع بكلا الاتجاهين على هيئة فقاعات تضاعف

إنزيمات أخرى في حقيقيات النواة تشترك في تضاعف DNA:

أ. إنزيم الـ Topoisomerase I: يحدث خلال الانفصال الأشرطة للـ DNA التفاف فائق موجب، وهذا يجعل من عملية التقدم المستمر لشوكة التضاعف أمراً صعباً، وبدلاً من التدوير الكلي للكروموسوم مقابل شوكة التضاعف، (هذا يحتاج إلى كمية كبيرة من الطاقة)، فإن إنزيم الـ Topoisomerase I يحدث ثغرة (عملية قطع) في شريط مفرد في حلزون الـ DNA، بحيث تصبح كل نهاية في هذا الشريط حرة لتدور في اتجاهات متعاكسة من الالتفاف الفائق لاسترخاء حلزون الـ DNA، ثم يعمل الإنزيم على لصق الثغرة مرةً أخرى. إن مصطلح الالتفاف الفائق الموجب Positive supercoiling يعني التفاف حلزون الـ DNA باتجاه يميني (Right-handed DNA helix) حول محوره، بحيث تدور لفاته باتجاه عقرب الساعة، ويحدث في الـ DNA الحلقي والحلقي مع نهايات ثابتة.

ب. إنزيم الـ Topoisomerase II (أو إنزيم الـ Gyrase في بدائيات النواة): يعتمد هذا الإنزيم على ATP، وهو يُسهّل عملية الانفصال في الحلزون المزدوج من خلال إزالة الالتفاف الفائق الموجب، إذ يتم ذلك بواسطة قطع الأشرطة المزدوجة، بحيث تُترك النهايات لتسترخي. وتحدث الالتفافات الفائقة السالبة (Negative)

(supercoils)، ثم عملية اللصق لها. هذا ويحدث الالتفاف السالب في الـ DNA الدائري والخطي مع نهايات ثابتة، وينتج بسبب برم حلزون الـ DNA ذو الالتفاف اليميني حول محوره باتجاه معاكس لعقرب الساعة بالنسبة للقاته، ويُفَضَّل في الأنظمة البيولوجية، لأنه يسهل انفصال حلزون الـ DNA إلى أشرطة مفردة.

إن الخطوات التمهيديّة أعلاه تولّد تركيب يُشبه الشكل V (V-shaped structure) والذي يُسمّى بشوكة التضاعف (Replication fork) والذي يستمر بالاتجاهين الأعلى والأسفل لحلزون الـ DNA، أي أن التضاعف يحدث في كلا الاتجاهين بالنسبة لفقاعة التضاعف (Replication bubble).

خطوات التضاعف Steps of replication

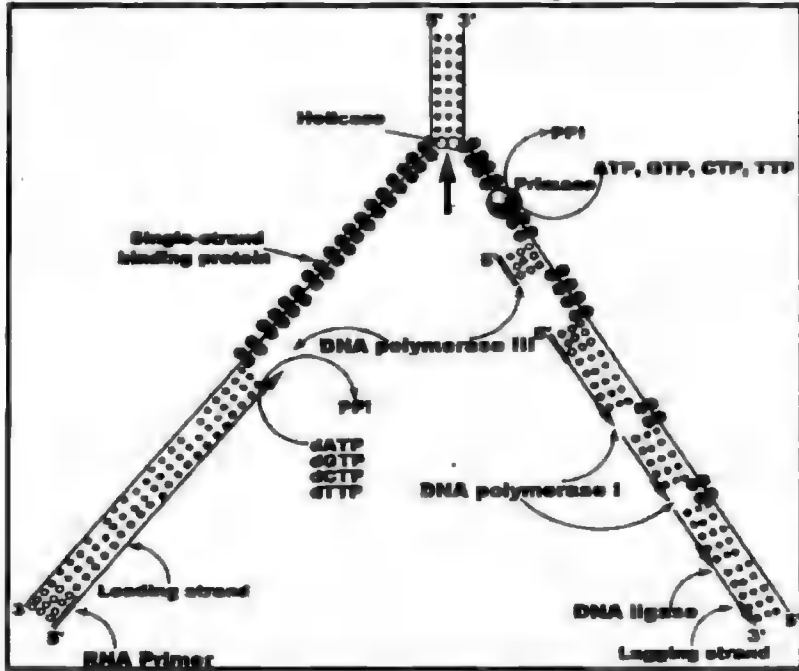
يحتاج التضاعف إلى الوحدات البنائية المتمثلة بالـ dATP ، dGTP ، dTTP ، dCTP بكميات متوازية بشكل جيد.

وعند المنطقة المتمثلة بأصل التضاعف (OriC) يعمل إنزيم الـ Helicase المعتمد على الـ ATP (بمساعدة الـ dnaA الذي يرتبط مع مواقع خاصة والـ dnaC) على فل التفاف الـ DNA، لتسهيل ارتباط البروتين المرتبط مع الـ DNA مفرد الشريط SSBP، الذي يعمل على استقرار الـ DNA بهيئة شريطية مفردة. وهذه العملية تحدث في الالتفاف الفائق الموجب للـ DNA والذي يتم تخفيفه بواسطة الالتفاف الفائق السالب الذي يتم مقابل شوكة التضاعف بواسطة إنزيم الـ DNA gyrase.

يعمل إنزيم الـ Primase على تصنيع البادئ (Primer) باتجاه $3' \rightarrow 5'$ طبقاً لمبدأ التزاوج القاعدي: $G \equiv C$ ، $A = U$ ، وباستخدام شريط الـ DNA ذو الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ (الشريط القائد The leading strand) كقالب. ويبدأ إنزيم الـ DNA polymerase III عملية التضاعف من خلال إضافة النيوكليوتيدات الرايوزية منقوصة الأوكسجين الحرة إلى النهاية $3' - OH$ الحرة في بادئ RNA وبالاتجاه $3' \rightarrow 5'$ وبشكل مستمر (الشريط القائد) وحتى نهاية جزيئة الـ DNA ، أو حتى بلوغ خواصر (أطراف) شوكة التضاعف. إن ذلك يتم طبقاً لمبدأ التزاوج القاعدي: $G \equiv C$ ، $A = T$ باستخدام شريط الـ DNA ذو الاتجاه $3' \rightarrow 5'$ كقالب.

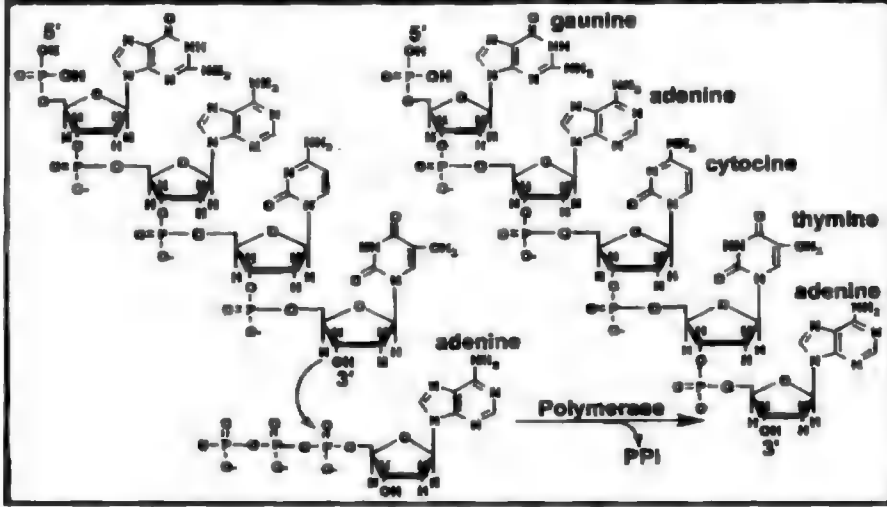
إن الشريط الآخر للـ DNA ذو الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ (أو ما يُسمى بالشريط المتلكن The lagging strand) يتلكن متأخراً لفترة قصيرة، حتى تكشف ما لا يقل عن 5000 1000 نيوكليوتيدة فقط في حقيقتات النواة (ولكن بحدود 150 - 250 نيوكليوتيدة فقط في حقيقتات النواة)، إذ يضع إنزيم Primase البادئ عند النهاية العليا منه عند شوكة التضاعف، أي بالاتجاه $5' \rightarrow 3'$. ويعمل إنزيم الـ DNA polymerase III بالتغطية التسلسلية باتجاه أسفل النسق من خلال تصنيع ما لا يقل عن 1000 نيوكليوتيدة من الـ DNA.

تُكرّر هذه العملية عندما يُمدّ من جديد جزء كافي من الـ DNA، ويظهر مرة أخرى بسبب التقدّم المستمر للشريط القائد، إذ يضع إنزيم Primase بادئ جديد تتم استطالته بواسطة إنزيم الـ DNA polymerase III حتى وصوله إلى بادئ RNA السابق وهكذا. إن كل مساحة كافية لعمل إنزيم الـ DNA polymerase III على الشريط المتلكن تدعى بقطعة او كازاكي (Okazaki fragment) (شكل 2 - 11).



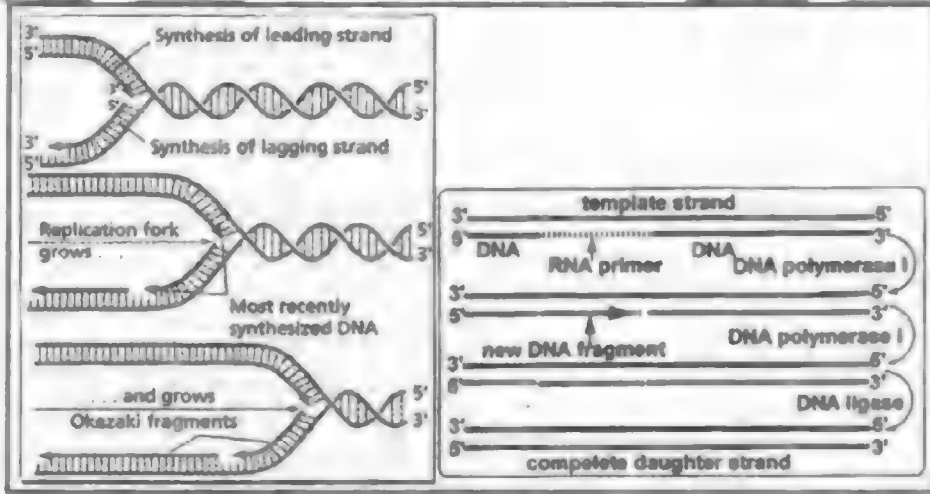
شكل (2 - 11). تضاعف الـ DNA وتكوّن الشريطين القائد والمتلكن

وهذا يعني بأن أحد الأشرطة يُبنى باتجاه شوكة التضاعف ($5' \rightarrow 3'$)، أي تكوين الشريط القائد، بينما يُبنى الشريط الآخر بالاتجاه المعاكس (ولكن أيضاً $5' \rightarrow 3'$)، أي تكوين الشريط المتلكئ (شكل 2-12).



شكل (2-12). إضافة النيوكليوتيدات بواسطة إنزيم Polymerase

وأخيراً يتم إزالة البوادي وملء فراغاتها بترجمة الشفرات بالاتجاه $5' \rightarrow 3'$ (nick translation) بواسطة إنزيم DNA polymerase I. وبالنسبة للنهاية $5'$ لقطع DNA التي بُنيت بواسطة إنزيم DNA polymerase III فإنه يتم ربطها مع النهاية $3'$ لقطع DNA التي بُنيت بواسطة إنزيم DNA polymerase I بفعل الإنزيم اللاصق (اللاحم، الرابط Ligase) المعتمد على ATP، كما هو موضح في الشكل (2-13).



شكل (2 - 13). الترتيبات النهائية لعملية تضاعف الـ DNA

التيلومير (القطعة الطرفية) وإنزيم التيلوميريز

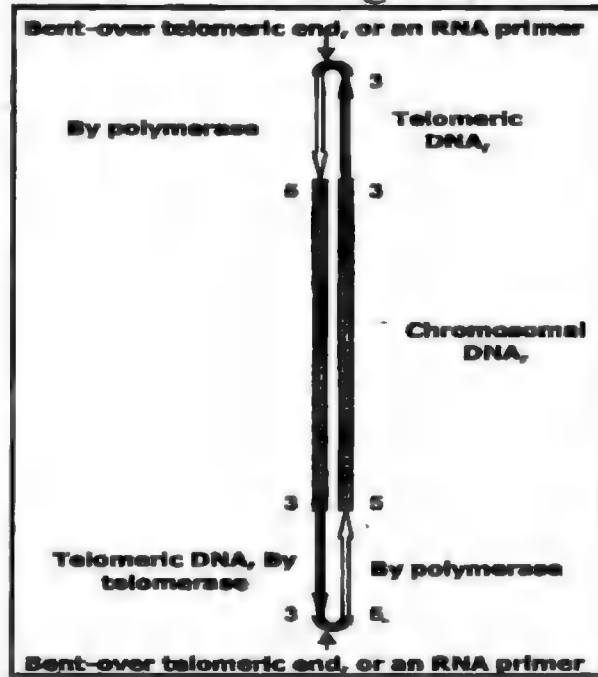
Telomere and Telomerase

نتيجة لفعل الإنزيمات الخارجية (Exonucleases) النشطة في كل خلية، فإن النهايات الكروموسومية مُعرّضة للقطع باستمرار، وهذا يُسارع بفقدان قطعة اوكازاكي كاملة من شريط الـ DNA الملتكّي عندما يكون امتداد الـ DNA المتبقي أقل من طول الحد الأدنى لقطعة اوكازاكي، ومن ثمّ سوف لن يتضاعف.

التيلومير هي مكررات غير جينية (Gene-less repeats)، تتكوّن من تسلسل نيوكليوتيدي قصير، تُضاف إلى نهايات الكروموسومات بواسطة إنزيم التيلوميريز. يُعدّ القصر التيلوميري وفقدان جينات أساسية في نهايات الكروموسومات من الأساسيات لإحدى النظريات المتعلقة بتفسير الشيخوخة.

إن إنزيم التيلوميريز عبارة عن معقد بروتيني - نيوكليورايبوزي (Ribonucleo-protein)، وذو قابلية استنساخ عكسية (Reverse transcriptase)، يتركّب من عدد من البروتينات وجزيئة RNA طرفية (Telomeric RNA molecule).

يستخدم هذا الإنزيم تسلسل خاص من جزيئة RNA الخاصة به كقالب لإضافة مكررات نيوكليوتيدية سداسية من DNA مُكَمَّل من (5'-TTAGGG-3') تسلسل يتكرر إلى 6000 زوج قاعدي أو أكثر إلى النهايات 3' لكل كروموسوم خلال الطور البيني لدورة الخلية البشرية، ثم يعمل إنزيم الـ DNA polymerase على استخدام تسلسل التيلومير كقالب وبادئ الـ RNA (أو منصة 3' نفسها كبادئ، طالما أنها في العادة أطول من منصة 5'، وتنطوي على نفسها بـ 2 أو 4 تراكيب شريطية من خلال التزاوج القاعدي) لتكوين تسلسل مُكَمَّل له على النهاية 5' للـ DNA، ولذلك فإن الـ DNA عند التيلومير سيكون مزدوج الشريط ومغلق (شكل 2 - 14).



شكل (2 - 14). إضافة التيلوميرات إلى نهايات DNA الكروموسوم

تكون التيلومير أطول في الخلايا الجرثومية (Germ cells) والزيجوت، بسبب فعالية إنزيم التيلوميريز العالية، وتصبح أقصر خلال الانقسامات الخلوية اللاحقة، وكذلك في الشيخوخة. إن ذلك يوضح جزئياً إحدى السليات لكلونة الحيوانات التي يحدث بسببها شيخوخة مبكرة، طالما أن الخلية الواهة للنواة (Nuclear donor cell)

سوف تكون عند مرحلة شيخوخة، مقارنةً مع الزيجوت الطبيعي، وعليه سيولد الحيوان المكلون شائخاً.

ومن وظائف التيلومير هي:

(1) منع عملية إعادة التشكيل (Recombination) للنهايات الكروموسومية مع DNA غريب.

(2) استقرارية نهايات الكروموسومات بمساعدة تداخل بروتيني خاص بتسلسل محدد.

(3) السماح بالتضاعف للنهايات القصوى للكروموسوم.

(4) إن فقدان التيلومير يؤثر على قابلية إصلاح كسور الأشرطة المزدوجة، وعلى أية حال فإن العبور (Cross-over) يكون شائع نسبياً عند مناطق التيلومير أكثر منه بالقرب من السنتروميرات (Centromeres).

تكون التيلوميرات طويلة في الخلايا السرطانية أكثر منها في الخلايا الطبيعية، بسبب زيادة فعالية إنزيم التيلوميريز في الخلايا السرطانية، ولذلك فإن استخدام مثبطات إنزيم التيلوميريز وتحطيم جينه تُعدُّ من الطرق العلاجية الروتينية المنطقية.

علاقة الوراثة بطول العمر ودور التيلوميرات:

لقد كشفت الأبحاث العلمية في هذا المجال بأن هنالك علاقة بين عدد مرات الانقسام للخلية والعمر، إذ إن هنالك ما يُشبه الساعة في الخلية الحية تنقص كالشمعة المحترقة في كل انقسام خلوي، بسبب حدوث قصر في DNA التيلوميرات، أي توجد علاقة عكسية بين طول التيلوميرات وعدد مرات الانقسام الخلوية. والسؤال المطروح هنا، لماذا تقصر التيلوميرات كلما انقسمت الخلية؟ إن انقسام الخلية الواحدة إلى اثنتين يرافقه انقسام الـ DNA إلى اثنتين أيضاً، ويرافق ذلك نقصان جزء صغير من الـ DNA مُزدوج، إذ إن الأنزيمات التي تعمل على صنع نسخ جديدة من الـ DNA لا تستطيع الالتحام دائماً مع أطراف الـ DNA، لذلك تُهمل المواقع الطرفية له، فتقصر تيلوميرات، وقد يحصل التصاق للكروموسومات مع بعضها، ويولد ذلك خللاً ينتج عنه الشيخوخة عند توقف الخلية عن الانقسام.

ومن جانب آخر هنالك حدود لعدد المرات التي تنقسم فيها الخلايا، وهذا يعني بأن الخلايا تتمتع أيضاً بساعة خاصة لعدد مرات الانقسام، وهذا يرتبط طردياً مع طول العمر. ففي الإنسان مثلاً يتراوح المعدل بين 50 - 70 انقسام، بينما في السلحفاة التي تُعمر 175 سنة، يكون بحدود 125 انقسام.

إن زيادة طول التيلوميرات يمكن أن يُطيل عمر الخلية، إذ إن الإنزيم المسؤول عن تصنيعها (التيلوميريز) يعمل على إطالة عمر الخلية، فقد وُجد أن الجين المشفر لهذا الإنزيم يقع على الكروموسوم الخامس، وبإمكانه أن يعكس عقارب الساعة، ويُعيد طول التيلومير الأصلي.

وتنشط إنزيمات التيلوميريز في الخلايا التناسلية (البويضات والنطف). وتعمل على إضافة تيلوميرات للخلايا المتضررة، ولكنها إذا أفرطت في النشاط، من الممكن أن تؤدي إلى السرطان.

هذا ولو حظ أن التيلوميرات تكون قصيرة جداً عند مرضى الشيخوخة المبكرة (Progeria)، بحيث يكبر المريض من 5 - 10 سنة مقابل كل سنة عند الأشخاص الطبيعيين. يترافق هذا المرض مع حدوث طفرات تؤدي إلى اختلالات في الغلاف النووي، إذ يُصاحب بعض الطفرات في الجين المشفر لبروتين Lamin A (يُشكّل مع بروتين Lamin B ليفات تبطن الغلاف النووي مكونة القشرة النووية)، فمثلاً طفرة G608G لا تؤدي إلى تغيير في تسلسل البروتين، ولكن تكون موقع اتصال بسبب فقدان 50 حامض أميني من ليف الـ Lamin A. تسبب هذه الطفرة مرض الشيخوخة المبكر (Hutchinson-Gilford Progeria) (شكل 2 - 15). كما أن حدوث طفرات في ثلاثة بروتينات أخرى للغلاف النووي يُسبب أمراضاً مُشابهة.



شكل (2-15). طفلان مصابان بمرض الشيخوخة المبكر

تحصل حالة الخرف المبكر الوراثي أو ما يُسمى بمتلازمة ورنر (Werner syndrome) في الغالب بعد سن العشرينات، والتي تتميز بفقدان الإحساس بالأطراف. وقد تم في عام 1996 اكتشاف الجين المسؤول عن ذلك، إذ تبين حدوث تحول في الجين الموجود على الكروموسوم الثامن يُعيق إنتاج إنزيم ضروري لفك حلزون الـDNA.

وعلى الكروموسوم التاسع تم اكتشاف جين مسؤول عن تكوين بروتينات تسمى E2 ، E3 ، E4 ، فإذا شقّر هذا الجين إلى E2 ، E3 فإن هذه البروتينات تمنع الألياف من الالتصاق بالخلية العصبية، فلا يحدث مرض الزهايمر. في حين إذا شقّر هذا الجين إلى بروتين E4 فإنه لا يمنع هذا الالتصاق فينتج عن ذلك المرض.

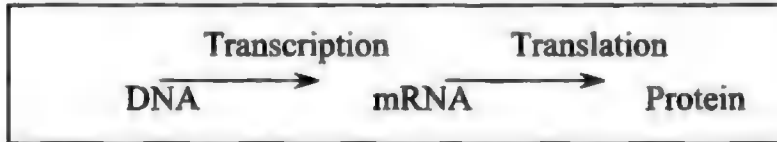
كما تم اكتشاف جينات مناعية مهمة تقع على الكروموسوم السادس تُسمى DR1 و DR9 ، إذ يساعد الجين DR1 على الوقاية من الإصابة بالأمراض. وعلى العكس يكون الجين DR9 غير مرغوب، ومن سوء حظ الأشخاص الحاملين له هو تعرّضهم المستمر للأمراض مقارنةً بالجين الأول.

وأظهرت النتائج وجود إنزيم يقع جينته على الكروموسوم رقم 21 يمنع حدوث الأضرار الناتجة عن الجذر الحر (O) من خلال نزع الإلكترون الزائد في هذا الأوكسيد الحارق. وقد لوحظ بأن ها الإنزيم يختلف من شخص إلى آخر، إذ يكون الإنزيم عند المعمرين أقوى من غيرهم.

إن الجذور الحرة تضر كثيراً بالـDNA، ولكن بفضل آليات الإصلاح الموجودة في الخلية يتم ترميم هذه الضرر من خلال تلك الإنزيمات. ولكن قد تتكدس الأضرار، مما يُجبر إنزيمات قص الـDNA إلى استئصال الجزء المتضرر، لذلك يحدث انتحار خلوي لكي لا يضر بالجسم، كون تلك الخلايا تحوي DNA كثير الضرر، ولكن المشكلة هنا بأنه لو حصل مثل هذا الانتحار في خلايا الدماغ، أدى ذلك إلى تدهور في وظائف الدماغ.

انسياب المعلومات الوراثية: Flow of genetic information:

في أغلب الكائنات الحية يتم انسياب المعلومات الوراثية باتجاه واحد من شفرات الجين المخزنة في الـDNA بواسطة الاستنساخ (Transcription) إلى نسخة مُرسلة بهيئة mRNA والتي تُترجم فيما بعد إلى بروتين ينجز وظيفة الجين.

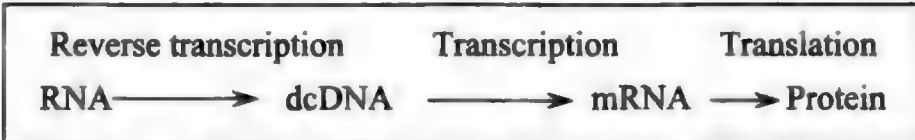


ملاحظة: نطلق على الشفرة ثلاثية النيوكليوتيدات Triple code عند وجودها على الـDNA اسم Code وتعرف: بأنها تسلسل من قواعد في ثلاثيات Sequence of bases in threes. أما عند تواجدها (استنساخها) على شريط mRNA فتسمى Codon وتعرف: بأنها التسلسل المكمل من القواعد في ثلاثيات Complementary sequence of bases in threes. أما عند تواجدها على الـtRNA فتسمى الشفرة المضادة Anticodon وتعرف: بأنها تسلسل من ثلاث قواعد مكمل للشفرة (Codon).

تمتلك فايروسات Retroviruses في مركزها (Core) مادة وراثية بشكل RNA وليس DNA. ولذلك فإن ميكانيكية انسياب المعلومات الوراثية تكون معكوسة، أي

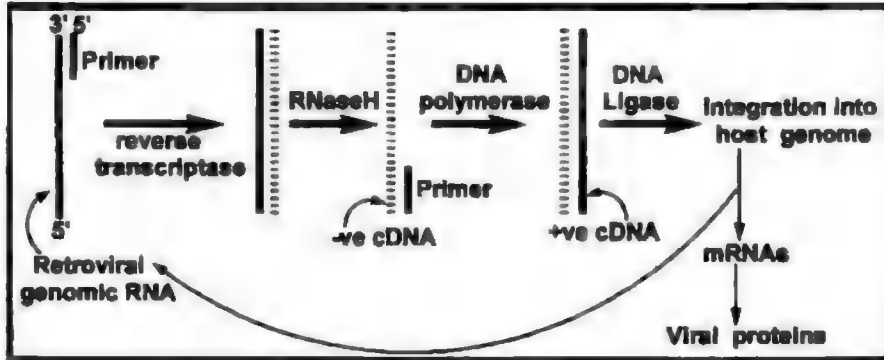
من الـ RNA إلى الـ DNA ثم إلى mRNA ثم إلى بروتين خلال دورة الحياة لتلك الفيروسات.

إن إنزيم الاستنساخ العكسي (Reverse transcriptase) الموجود في تلك الفيروسات يعمل على تصنيع نسخة DNA مُكمّلة cDNA (Complementary DNA) لقالب RNA الوراثي. وهذا هو سبب تسميته بإنزيم الاستنساخ العكسي. ثم يعمل الإنزيم نفسه (أو إنزيم RNAase H) على تكسير قالب الـ RNA في الهجين المتكوّن من DNA/RNA. ويعقب ذلك تصنيع شريط DNA مُكمّل ثاني لشريط الـ DNA الذي صُنِعَ أولاً لتكوين شريط مزدوج من الـ DNA المُكمّل dcDNA.



إن شريط الـ cDNA المزدوج الفيروسي المُصنّع حديثاً يدخل إلى نواة الخلية المصابة ويتكامل بنفسه من خلال إعادة التشكيل في كروموسوم الخلية المُضيّفة. كما يتم بعد ذلك استنساخ الجينات الفيروسية بهيئة أشرطة mRNA لترجم إلى بروتينات فايروسية، وكذلك بهيئة RNA جينومي، والذي يتجمع مع البروتينات الفيروسية لتكوين فيروسات جديدة.

هذا ويُعدّ إنزيم الاستنساخ العكسي من الأهمية في تقنية الهندسة الوراثية، وخصوصاً في مجال إنتاج البروتينات والمواد العلاجية والاقتصادية المهمة عبر هذه التقنية (شكل 2 - 16).



شكل (2 - 16). تصنيع الـ cDNA لبعض الفيروسات

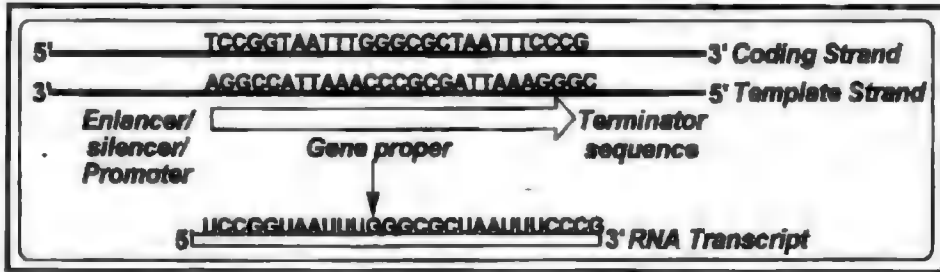
تصنيع الـ RNA (الاستنساخ) (RNA synthesis (Transcription):

وهي العملية التي يتم من خلالها إنتاج نسخة RNA من منطقة خاصة من الـ DNA، أي أساس الجين. ويُطلق على مصطلح وحدة استنساخية (Transcription unit) على تسلسل محدود من الـ DNA يتكوّن من أساس الجين ومناطق السيطرة التي تشمل على تسلسل البدء والسيطرة على المعدل الأساسي للاستنساخ، أو ما يُطلق عليه بالحقّاز (Promoter)، وتسلسلات استجابة الجين التنظيمية (المُشجّع / المُخمد Enhancer / Silencer)، وكذلك تسلسل إنهاء الاستنساخ. كما يوجد بين الجينات أو المناطق الموجودة بين الجينات ذات العلاقة ما يُطلق عليه بالتسلسلات العازلة (Insulator sequences) والتي تعمل على فصل الجين (أو الجينات) التنظيمية التناسقية، لذلك فإن التسلسلات التنظيمية سوف تعمل فقط على ذلك الجين المعزول (أو الجينات المعزولة). ويمكن تلخيص ذلك فيما يأتي:

أ. تسلسلات المُشجّع / المُخمد للجين The gene enhancer/silencer: وهي تسلسلات مسؤولة عن استجابة الجين التي تتحكّم بمعدل تنظيم التعبير الجيني Gene expression (أكثر من المستوى الأساسي).

ب. منطقة حقّاز الجين The gene promoter region: أو ما يُطلق عليه بدء الاستنساخ، وهو تسلسل 3' → 5' من DNA تنظيمي يقع إلى خارج يسار (-Up stream) أساس الجين.

- ج. المنطقة المستنسخة أو أساس الجين Transcribed region or gene proper: تسلسل الـ DNA الذي يستنسخ بهيئة hnRNA أو أنواع أخرى من الـ RNA.
- د. منطقة الإنهاء Termination region: تسلسل DNA تنظيمي يقع إلى خارج يمين (Down-stream) أساس الجين لبعض الجينات، وعنده ينفصل إنزيم الـ DNA polymerase عن قالب الـ DNA (شكل 2 - 17).



شكل (2 - 17). استنساخ الـ RNA

وظيفة وتركيب حفاز الجين

Structure and function of the gene promoter

وهو تسلسل بدء الاستنساخ، ويعمل في اتجاه قراءة نسق الجين نفسه ($5' \rightarrow 3'$)، ويقع بشكل مباشر إلى خارج يسار أساس الجين، إذ يرتبط إنزيم بلمرة الـ RNA (RNA polymerase) مع قالب DNA عند حفاز الجين لبدء المعدل الأساسي من الاستنساخ. إن بعض الحفازات يكون ضعيفاً، والبعض الآخر يكون قوياً، وعنده يكون معدل الاستنساخ سريع جداً، ومع ذلك فإن بعض الجينات تكون عديمة الحفاز (Promoterless genes).

حفاز بدائيات النواة Prokaryotic promoter:

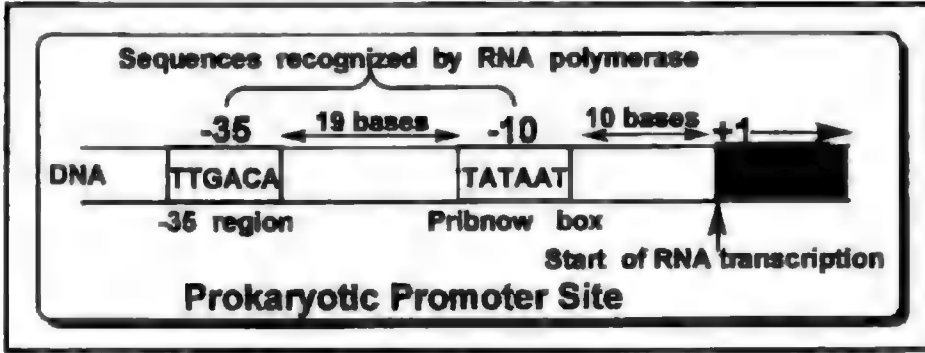
وهي منطقة يتم تمييزها بواسطة إنزيم الـ RNA polymerase، ويكون أبسط تركيباً من حفاز حقيقيات النواة، ويتكوّن من ثلاثة أجزاء:

1. صندوق بربنو (Pribnow box): وهو امتداد من 6 نيوكليوتيدات متمثلة بـ TATAAT ويقع بحدود 10 نيوكليوتيدة خارج يسار موقع بداية الاستنساخ.

2. منطقة The - 35 region: وهي امتداد من 8 نيوكليوتيدات متمثلة بـ TGTGACA وتقع بحدود 35 نيوكليوتيدة خارج يسار موقع بدء الاستنساخ.

3. الامتداد الفاصل The spacer stretch: يتكوّن من 19 نيوكليوتيدة تقريباً ويقع بين صندوق برينو ومنطقة The-35 region.

مع العلم أن منطقتي صندوق برينو و The-35 region يتم تشخيصهما بواسطة إنزيم الـ RNA polymerase، علماً أن المناطق الثلاث أعلاه ترقيم بأرقام سالبة (1 - ، 2 - ، الخ)، ابتداءً من أول قاعدة (ترقيم +1) في أول شفرة بدء الاستنساخ للـ RNA (Start of RNA transcription) (شكل 2 - 18).

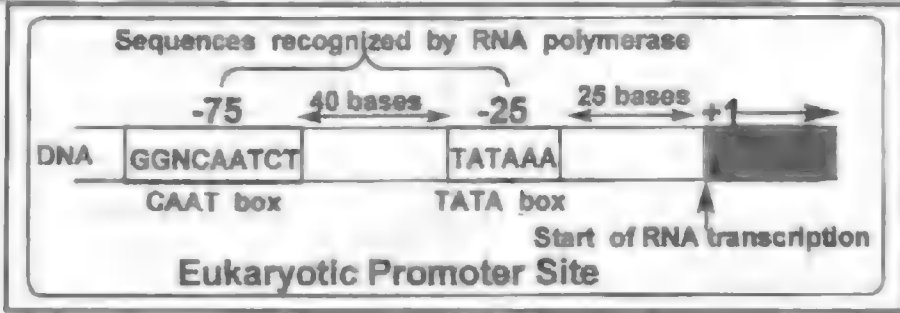


شكل (2 - 18). موقع حفاز بدائية النواة

حفاز حقيقيات النواة Eukaryotic promoter:

وهو أكثر تعقيداً من حفاز بدائيات النواة، ويتكوّن على الأقل من ثلاثة أجزاء:

1. صندوق هوكينز أو صندوق تانا (Hogness or TATA box): وهو امتداد من 6 نيوكليوتيدات يقع بحدود 25 نيوكليوتيدة خارج يسار موقع بدء الاستنساخ.
2. صندوق CAAT (CAAT box): وهو امتداد من 9 نيوكليوتيدات يقع بحدود 80 - 70 نيوكليوتيدة خارج يسار موقع بدء الاستنساخ.
3. الامتداد الفاصل (The space stretch): امتداد من الـ DNA مكوّن من 40 نيوكليوتيدة ويقع بين صندوقي TATA و CAAT (شكل 2 - 19).



شكل (2 - 19). موقع حفاز حقيقية النواة

عناصر استجابة الجين (المُشجّع أو الخامد)

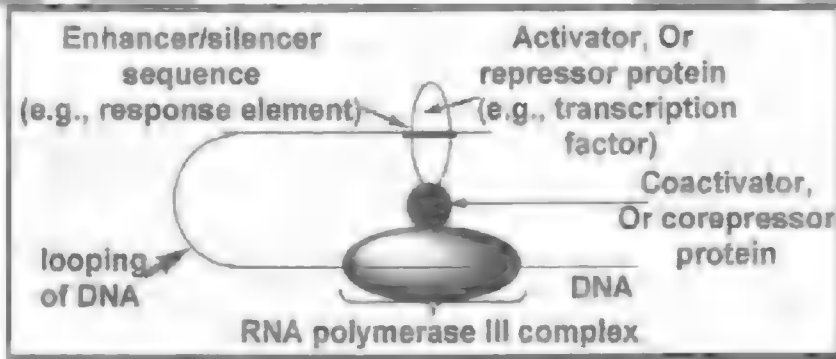
Gene response elements (Enhancer or Silencer)

وهي تسلسلات تنظيمية لعملية الاستنساخ (Transcription regulatory sequences)، والتي قد تتعدد بآلاف النيوكليوتيدات باتجاه خارج اليسار أو اليمين من أساس الجين، أو حتى تقع ضمن أساس الجين، وتعمل في أي اتجاه، أي 5' → 3' أو 3' → 5'.

وقد تعمل هذه التسلسلات على تنشيط الاستنساخ أكثر من المعدل الأساسي، لذلك تُدعى عناصر التشجيع (Enhancer elements)، أو تثبيط الاستنساخ بأقل من المعدل الأساسي، ولذلك تُدعى عند ذلك بعناصر الخمد (Silencer elements). من الأمثلة على ذلك، عناصر الاستجابة الهرمونية (Hormone-response elements) للهرمونات الستيرويدية والثايرويدية وفيتامين D وفيتامين A ومؤثرات أخرى.

إن البروتينات المنشّطة (المُشجّعة) أو المثبطة التي ترتبط مع تلك العناصر تدعى بعوامل الاستنساخ (transcription factors)، وتتداخل مع إنزيم الـ RNA polymerase بشكل مباشر أو غير مباشر من خلال بروتينات مُنشّطة مرافقة أو مثبطة مرافقة (Coactivator or corepressor proteins) لزيادة أو تقليل معدل الاستنساخ.

تحتوي الجينات في العادة على عدد من العناصر المنظمة، ولكن بعض الجينات لا تمتلك ذلك، خصوصاً وأن الجينات المستنسخة التكوينية تمتلك معدل ثابت من الاستنساخ الأساسي (شكل 2 - 20).



شكل (2 - 20). عناصر استجابة الجين

إنزيم بلمرة الـ RNA (RNA polymerase):

يمكن تلخيص أنواع إنزيمات بلمرة الـ RNA لبدايات وحقيقيات النواة بالجدول (2 - 2) أدناه:

جدول (2 - 2). الأنواع الوظيفية والمقارنة بين إنزيمات بلمرة RNA المعتمدة على DNA في بدايات وحقيقيات النواة

في بدائيات النواة In prokaryotes	في حقيقيات النواة In eukaryotes
• نوع مفرد مسؤول عن تصنيع كل أنواع الـ RNA	• هنالك ثلاثة أنواع، كل واحد منها متخصص في تصنيع نوع خاص من الـ RNA
• منتجات إنزيم الـ RNA polymerase لا تتطلب إلى تحوير أو تتطلب تحويرات بسيطة بعد الاستنساخ.	• أغلب منتجات إنزيم الـ RNA polymerase تحتاج إلى تحويرات كبيرة بعد الاستنساخ وخصوصاً mRNA.
• الإنزيم الكلي (Holoenzymes) يتكوّن من 5 وحدات ثانوية: وحدتين ثانويتين متماثلتين من نوع α ، وحدتين ثانويتين متشابهتين ولكن ليس متماثلتين من نوع β و β' ، ووحدة ثانوية منظمة من نوع σ ، وبذلك يتكون الإنزيم من: $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. إن الجزء المكوّن لقلب (Core) الإنزيم	• تكون إنزيمات بلمرة الـ RNA أكثر تعقيداً في التركيب وتتكوّن وحدات ثانوية تصل إلى 16. إن الأنواع الثلاثة من إنزيمات بلمرة الـ RNA هي: 1. RNA polymerase I: وهو مسؤول عن تصنيع الجزيئات الكبيرة من الـ rRNA. ويكون غير حساس للـ α -amanitin (السم المنتج من فطر المشروم Mushroom poison).

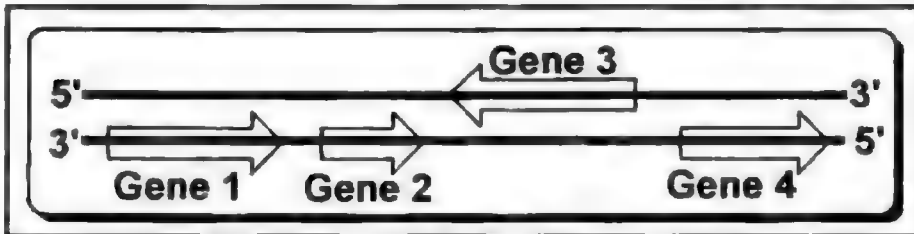
في بدائيات النواة In prokaryotes	في حقيقيات النواة In eukaryotes
يتكوّن من أربع وحدات ثانوية بعد استثناء العامل α ، أي أنه من $\alpha\beta\beta'$.	2. RNA polymerase II وهو مسؤول عن تصنيع جزيئات mRNA ويكون حساساً للتراكيز المنخفضة للـ α -amanitin.
	3. RNA polymerase III وهو مسؤول عن تصنيع الجزيئات الصغيرة للـ RNA. مثل tRNA والـ 5S rRNA ويكون حساساً للتراكيز العالية للـ α -amanitin.

خطوات الاستنساخ Steps of transcription:

1. البدء Initiation:

يحدث البدء على أحد الأشرطة المفردة من وحدة الاستنساخ (الجين) والذي يُدعى الشريط القالب Template (أو الشريط غير المُشفّر Non-coding) وهو يكمل الـ RNA، ولا يحدث على الشريط الآخر (أو ما يسمى بالشريط المُشفّر Coding strand). يشابه الشريط المُشفّر تسلسل الـ mRNA (فيما عدى وجود U بدلاً من T الموجود في الشريط المُشفّر).

والسؤال المطروح أي من أشرطة الـ DNA يمثل القالب، وأي منها يمثل الشريط المُشفّر؟ وهنا لا بُدّ من الإشارة إلى اختلاف جين عن آخر، ولكنه في العادة يُقرأ بالاتجاه $5' \rightarrow 3'$ (شكل 2 - 21).



شكل (2 - 21). اتجاه استنساخ الجينات (موقع الشريط القالب قد يكون على خيط الـ DNA الأعلى أو الأسفل)

يُميز إنزيم RNA polymerase منطقة الحفاز بمساعدة العامل سكما σ (Sigma factor)، ثم يرتبط قلب الإنزيم بقوة مع الـ DNA، وحالما يرتبط قلب الإنزيم مع الـ DNA يعمل على فل 17 نيوكليوتيدة لفصل الشريطين عن بعضهما.

إن ارتباط الإنزيم مع الـ DNA بعملية متسلسلة، أي ارتباط عامل σ ثم قلب الإنزيم ($\alpha_2\beta\beta'$) الذي يبحث عن موقع بدء الاستنساخ (إطار القراءة المفتوحة Open reading frame الذي يبدأ عند TAC).

إن الـ RNA المُصنَّع يبدأ في العادة بقاعدة بيورينية، والتي تدخل في موقع البدء (The initiation site) للإنزيم. وهذه القاعدة النيوكليوتيدية الرايبوزية البيورينية في بدايات النواة تبقى في الـ mRNA الناضج، في حين تُزال من الـ mRNA الناضج بالنسبة لحقيقيات النواة، وذلك بسبب المعالجة ما بعد الاستنساخ (Post-transcriptional processing) قبل إضافة القلنسوة.

عندما تدخل النيوكليوتيدة الثانية عند موقع الاستطالة (The elongation site) للإنزيم، فإنها تكون آصرة فوسفاتية ثنائية الأستر (Phosphodiester bond) بين مجموعة OH-3' للسكر الرايبوزي لأول نيوكليوتيدة، و OH-5' لمجموعة الفوسفات على C5 للسكر الرايبوزي للنيوكليوتيدة الثانية.

2. الاستطالة Elongation:

يتحرر عامل سكما (σ factor) قبل بدء خطوة الاستطالة. إن الأنواع الأربعة من النيوكليوتيدات الرايبوزية ثلاثية الفوسفات: ATP ، GTP ، CTP ، UTP تستمر بالدخول في موقع البلمرة Polymerization (أو الاستطالة Elongation) للوحدة الثانوية β مع تحرير البايروفوسفات (PP_i)، وفي كل وقت تُضاف نيوكليوتيدة جديدة إلى سلسلة RNA النامية.

يستمر إنزيم RNA polymerase بالاستنساخ من 3' باتجاه النهاية 5' للشريط القالب طبقاً لمبدأ التزاوج القاعدي بأسلوب متوازي متعاكس (Anti-parallel manner)، وعليه يكون: $A = U$ و $G \equiv C$ و $T = A$ و $C \equiv G$. وتستمر عملية الاستطالة حتى بلوغ نقطة الإنهاء.

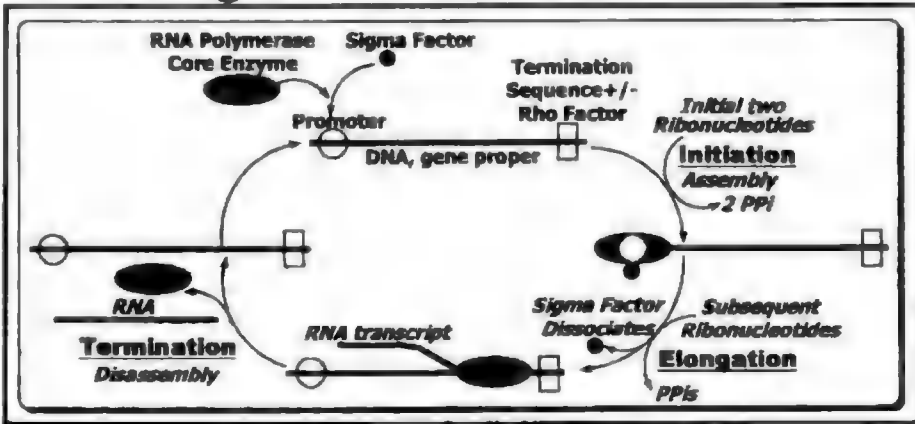
3. الإنهاء Termination:

قد يعتمد الإنهاء على رو ρ (rho factor-dependent) أو لا يعتمد.

أ. الإنهاء المعتمد على رو rho-dependent termination: وفيه يميز ويرتبط عامل رو مع DNA القالب، ثم يعمل على تفكيك معقد الـ Enzyme/RNA/DNA لتحرير إنزيم الـ RNA polymerase وتصنيع جزيئة RNA من شريط DNA القالب.

ب. الإنهاء الغير معتمد على رو rho-independent termination: وفيه يتوقف إنزيم الـ RNA polymerase عن الاستنساخ عندما تأخذ جزيئة RNA المصنعة الكاملة أبعادها الثلاثية مع تكوين تراكيب ثانوية خاصة مثل دبوس الشعر (Hairpin) الذي يليه تسلسل محدود من اليوراسيل (Oligo-U sequence). إن هذا يؤدي إلى توقف إنزيم الـ RNA polymerase، ومن ثم تفكك ماكينة الاستنساخ.

إن الإنهاء في حقيقيات النواة قد يكون أكثر تعقيداً، ويتضمن إضافة ذيل متعدد الأدنين (Polyadenylate tail). ويمكن تلخيص عملية الاستنساخ بالشكل (2 - 22).



شكل (2 - 22). مخطط يوضح عملية الاستنساخ

المضادات الحيوية المثبطة لعملية الاستنساخ

Antibiotic inhibitors of transcription

1. الـ Rifamycin: يرتبط هذا المضاد الحيوي مع قلب الإنزيم، بحيث يحتل موقع الارتباط بمادة التفاعل (Substrate binding site)، وبذلك يُثبِّط النيوكليوتيدات من الارتباط مع موقع البدء.

2. الـ Actinomycin D: يرتبط مع قالب الـ DNA ويثبِّط استنساخه من خلال منع حركة إنزيم الـ RNA polymerase على طول الـ DNA.

التحويلات بعد الاستنساخ التي على الـ RNA

Post-transcriptional modification of RNA

I. معالجة الـ mRNA (Processing of mRNA):

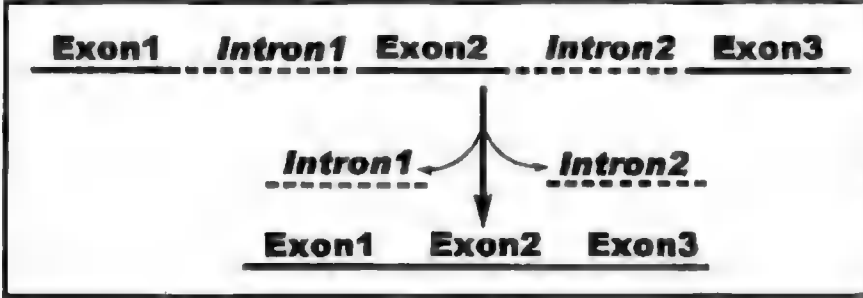
إن الـ mRNA الخام المستنسخ في حقيقيات النواة الذي ينتج في النواة يدعى بالـ RNA النووي المتباين hnRNA (Heterogeneous nuclear RNA). إذ تتضمن معالجة الـ mRNA بعد الاستنساخ نقصاناً في حجمه (إزالة الأنترونات)، وإضافة القلنسوة عند النهاية 5' (5'-capping)، وإضافة النهاية الذنبية عند النهاية 3' (3'-tailing) لتكوين الـ mRNA الناضج.

أ. إزالة الأنترونات (النقصان في الحجم)

Intron removal (Decrease in size)

وهذا ناتج عن استئصال أو إزالة التسلسلات الغير قابلة للترجمة الداخلية، أي الأنترونات (Introns) من التسلسلات القابلة للترجمة أو الأكسونات (Exons) بواسطة الـ Splicosome (أنظر الشكل 2 - 23 أدناه). إن الـ Splicosome عبارة عن تجمع يتكوّن داخل النواة، يتشكّل من الـ RNA النووي المتباين heteronuclear RNA (hnRNA أي أنه النسخة الأولية للـ mRNA أو tRNA أو rRNA) + 4 من الـ RNA النووي الصغير Small nuclear RNA (snRNAs: U1، U2، U5، و U4/U6) + أكثر من 50 بروتين.

يكون دور الـ snRNAs هو ربط نهاية كل أنترونة مع بعضها البعض بواسطة التزاوج القاعدي واستئصال وإزالة الأنترونة، ثم إعادة ربط الأكسونات. إن الفعالية الإنزيمية لمعقد الـ Splicosome تكمن في الـ snRNAs، ولذلك يدعى Ribozymes، أي بمعنى إنزيمات ذات تركيبة من الـ RNA.



شكل (2 - 23). إزالة الأنترونات من hnRNA حقيقيات النواة

تُسهّل إزالة الأنترونات انتقال الـ mRNA الناضج من النواة إلى الساييتوبلازم، وإلاّ فإنه سوف يتحلّل في داخل النواة. فعلى سبيل المثال الجين المسؤول عن الـ NO synthase البطاني يتكوّن من 22 كيلو زوج قاعدي، ويتملك 26 أكسونة و 25 أنترونة، إذ تعمل الأكسونات على تكوين بروتين من 130 كيلو دالتن مُركّب من 1200 حامض أميني.

هذا وإن أي خلل وراثي في استئصال الأنترونات قد يؤدي إلى حدوث مرض، فمثلاً على الأقل أحد أشكال المرض المعروف بيتا-ثلاسيميا (β -thalassemia) وهو المرض الذي يحدث فيه غياب للسلسلة β -chain للهيموجلوبين، ويبدو ناتجاً عن تغيّر نيوكليوتيدي في عملية الارتباط بين الـ exon-intron والذي يمنع عملية الاستئصال المناسبة.

ب. إضافة الذيل متعدد الأدينين عند الطرف 3'

Addition of polyadenylate 3'-tailing

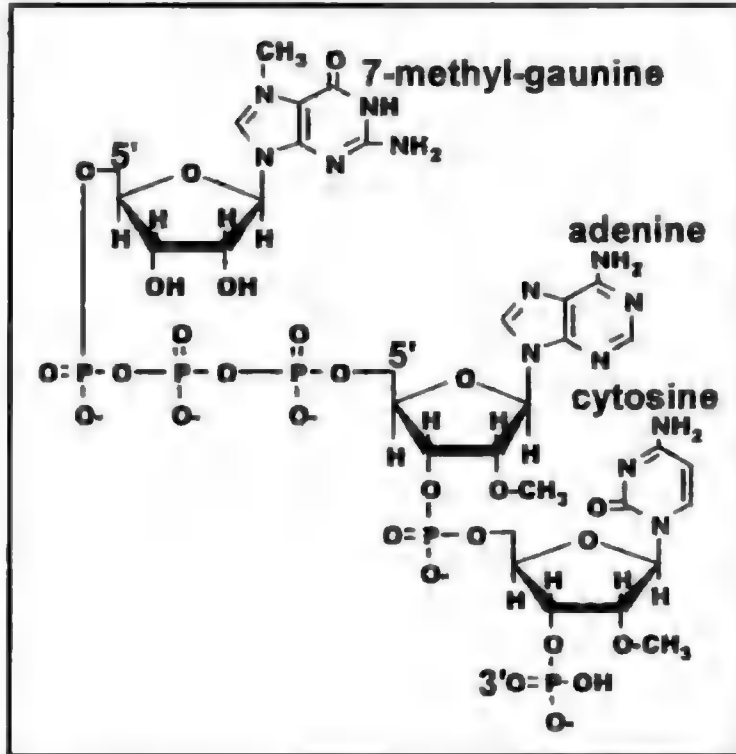
يتم في هذه العملية إضافة ذيل متعدد الأدينين مكوّن من 20 - 250 نيوكليوتيدة عند الطرف 3' بفعل إنزيم الـ Poly-A-polymerase، إذ يتم تشخيصه بواسطة تسلسل خاص بالقرب من الطرف 3' للـ mRNA (وهو AAUAAA). يعمل هذا الذيل على

حماية النهاية 3' للـ mRNA من الفعل الهاضم للإنزيمات القاطعة الخارجية بالاتجاه 3'→5' (3'→5' exonuclease)، ويسهل انتقال الـ mRNA إلى السايتوبلازم.

ج. إضافة القلنسوة (أو القبعة) 7-methyl-guanine عند الطرف 5'

Adding of 7-methyl-guanylate 5'-capping

وهي عملية إضافة 7-methyl-guanocine ثلاثية الفوسفات إلى النهاية 5' للـ mRNA بواسطة إنزيم خاص يدعى Guanylate transferase، إذ تلتصق القلنسوة (Cap) من خلال رابطة 5' مع 5' ثلاثية الفوسفات (5' to 5' transphosphate linkage) (شكل 2 - 24)، والتي تعمل على رفع مستوى ترجمة الـ mRNA وتحميه من فعل الإنزيمات القاطعة الخارجية بالاتجاه 5'→3' (5'→3' exonucleases) وإنزيمات الـ Phosphatases.



شكل (2 - 24). إضافة القلنسوة للنهاية 5' للـ mRNA

د. اللمسات النهائية التي تطرأ على mRNA قبل ترجمته Editing of mRNA

وهي التحوير الذي يطرأ على تسلسل mRNA الناضج بعد الانتهاء التام للمعالجات التي تحدث عليه، وانتقاله إلى السايوبلازم والذي يؤدي إلى تغير أو تشذيب في جزيئة البروتين. فعلى سبيل المثال Apolipoprotein B100 (يمتد من 4536 - 1 - حامض أميني، بوزن جزيئي 100 KD) يمثل الشكل الكبدي للمRNA الكامل، والـ B48 (يمتد من 1 - 2152 حامض أميني، بوزن جزيئي 48 KD) يمثل الشكل المُشذَّب المعوي للبروتين، إذ إن الشكل المعوي للمRNA ينتج بفعل إزالة مجموعة الأمين (Deamination) لقاعدة السايوتوسين في الشفرة CAA للحامض الأميني رقم 2153 وتحولها إلى قاعدة يوراسيل بواسطة إنزيم معوي خاص لإزالة مجموعة الأمين من السايوتوسين (Intestine-specific cytosine deaminase). إذ إن شفرة الـ UAA المتكوّنة هي عبارة عن شفرة توقّف (Stop codon) تعمل على التشذيب في الحجم من B100 إلى B48.

عمر النصف للمRNA (Half-life of mRNA):

إن عمر النصف للمRNA لا يتم فقط بواسطة الاستراتيجيات المشار إليها أعلاه، ولكن يتم التحكم فيه أيضاً بواسطة تسلسلات خاصة في mRNA تقع عند النهايات 5' و 3' لا تترجم وتعمل على تحديد عمر النصف، إذ إن هنالك بروتينات تنظيمية ترتبط مع تلك التسلسلات. فعلى سبيل المثال تتم السيطرة على نقل الحديد وتخزينه من خلال تنظيم عمر النصف للمRNA الخاص بنواقل الحديد والبروتينات الرابطة بواسطة البروتينات المنظمة بالحديد (Iron-regulated proteins).

الاختلافات بين mRNA في بدائيات وحقيقيات النواة

Differences between prokaryotic and eukaryotic mRNA

يمكن تلخيص تلك الاختلافات في الجدول (2 - 3) أدناه:

جدول (2 - 3). الاختلافات بين mRNA في بدايات وحقيقات النواة

الصفة	بدائيات النواة	حقيقات النواة
• عمر النصف	قصير	طويل
• عدد المسترونات Cistrons (المسترونات: وحدات الترجمة Translation unit)	متعدد المسترونات Polycistronic	أحادي المسترونات Monocistronic
• الأنترونات	لا توجد	توجد
• انفصال عملية الترجمة عن عملية الاستنساخ	كلا	نعم
• معالجات ما بعد الاستنساخ (إضافة القلنسة، إضافة الذيل، استئصال الأنترونات، اللمسات الأخيرة على mRNA)	كلا	نعم

II. معالجة الـ tRNA (Processing of tRNA):

إن نسخة الـ tRNA الأولية تعتبر كأصل كبير، وتحتوي أكثر من tRNA واحد، إذ يتم معالجتها بفعل نوع خاص من إنزيمات الـ Ribonucleases كما تتضمن هذه العملية أيضاً إزالة الأنترونات وشرط التسلسل القائد 5'-leader sequence. هذا ويتم أيضاً تحويل في بعض نيوكليوتيدات الـ tRNA إذ تشمل عمليات التحويل هذه على الميثلة (Methylation) وإزالة الأمين (Deamination) والألكلة (Alkylation) والاختزال (Reduction) وإضافة الجليكوسيل (Glycosylation)، وأخيراً استبدال النهاية 3'-terminal UU بنهاية CCA في ذراع استقبال الحامض الأميني عند الطرف 3' بواسطة إنزيم Nucleotidyl transferase.

III. معالجة الـ RNA الرايبوسومي (Processing of ribosomal RNA):

يتم التعامل مع جزيئة أصل كبيرة 45S عديمة الأنترونات، إذ تشطر بواسطة إنزيم قاطع داخلي (Endonuclease) متخصص، وخارجي (Exonuclease) متخصص إلى أنواع من rRNA وهي: 28S, 18S, 5.8S. أما بالنسبة للنوع 5S rRNA فإنه يأتي من جين منفصل.

صفات الشفرة الوراثية Characters of the genetic code

الشفر (Codon) عبارة عن تسلسل DNA من ثلاث قواعد يستنسخ في mRNA (لكن بدل T يستنسخ U) والذي يحدد نوع وموقع الحامض الأميني في البروتين المترجم. وفي العادة تتم القراءة بالاتجاه $5' \rightarrow 3'$ في mRNA، ويتم تحديدها حسب التكامل القاعدي بالأسلوب المتوازي المتضاد (Anti-parallel manner) بواسطة الشفرة المضادة (Anticodon) الموجودة في tRNA (بالاتجاه $3' \rightarrow 5'$).

إن كل التشكيلات البديلة الثلاثية المحتملة للقواعد الأربع الداخلة في تركيب الـ DNA أو RNA تعطي 64 شفرة ثلاثية أو الأنواع الممكنة للأحماض الأمينية. كما أنه من بين هذه الـ 64 شفرة يوجد ثلاث شفرات (UAA , UAG , UGA) والتي تدعى شفرات غير حساسة Non-sense (أي عديمة المعنى Meaning-less) وذلك لأنها لا تشفر إلى حامض أميني ولكنها تؤثر إنهاء الترجمة للـ mRNA. ويبين الجدول (2 - 4) أنواع الشفرات الوراثية المستنسخة في mRNA.

جدول (2 - 4). الشفرات الوراثية المستنسخة في mRNA والأحماض الأمينية المترجمة عنها

1 st nucleotide	2 nd nucleotide				3 rd nucleotide
	U	C	A	G	
U	Ph-alanine	Serine	Tyrosine	Cysteine	U
	Ph-alanine	Serine	Tyrosine	Cysteine	C
	Leucine	Serine	Stop	Stop	A
	Leucine	Serine	Stop	Tryptophan	G
C	Leucine	Proline	Histidine	Arginine	U
	Leucine	Proline	Histidine	Arginine	C
	Leucine	Proline	Glutamine	Arginine	A
	Leucine	Proline	Glutamine	Arginine	G

1 st nucleotide	2 nd nucleotide				3 rd nucleotide
	U	C	A	G	
A	Isoleucine	Threonine	Asparagine	Serine	U
	Isoleucine	Threonine	Asparagine	Serine	C
	Isoleucine	Threonine	Lysine	Arginine	A
	Methionine	Threonine	Lysine	Arginine	G
G	Valine	Alanine	Aspartate	Glycine	U
	Valine	Alanine	Aspartate	Glycine	C
	Valine	Alanine	Glutamate	Glycine	A
	Valine	Alanine	Glutamate	Glycine	G

وفيما يلي أهم صفات الشفرة الوراثية:

1. التخصص أو عدم الالتباس Specific or unambiguous: إذ إن كل شفرة تكون متخصصة لحامض أميني مفرد، فمثلاً UUU تشفر إلى الفينيل الانين (Phenylalanine) فقط.
2. الانحلال Degeneracy: طالما أنه يوجد 61 شفرة وراثية تشفر للأحماض الأمينية، وأن كل حامض أميني قد يشفر له بوضع الشفرات. إن الـ 61 شفرة لا تنقسم بالتساوي على الـ 20 حامض أميني الداخلة في تركيب البروتين، فالأرجنين (Arginine) مثلاً يمتلك 6 شفرات، وهي (AGG, AGA, CGG, CGA, CGC,)، وفي حين أن الميثيونين (Methionine) يمتلك شفرة واحدة فقط، وهي AUG، وهذا هو سبب تسمية الشفرة بالمنحلة (Degenerate).
3. العمومية Universality: تكون الشفرة الوراثية عامة، أي تشخص الحامض الأميني نفسه في كل الكائنات الحية من الفايروسات والبكتريا والنباتات والحشرات إلى اللبائن. ولكن هناك استثناء في جينوم المايكوبلازما، إذ تشخص AUA الميثيونين (Methionine) بدلاً من الأيزوليوسين (Isoleucine)، وتشخص UGA التريبتوفان

(Tryptophan) بدلاً من أن تكون شفرة توقف أو شفرة غير حساسة في الأنظمة الأخرى. كما أن شفرتي الأرجينين AGA و AGG تكون شفرتا توقف في جينوم المايكوبلازما.

4. عدم التداخل Non-overlapping: إن شفرات mRNA تقرأ بأسلوب مستمر بالاتجاه 5' → 3' بدون أي تداخل، وبهيئة تسلسل من ثلاث قواعد، أي أنه لا توجد قواعد بين كل شفرتين متاليتين، لذلك فإن إضافة أو إزالة أي قاعدة يؤدي إلى إزاحة إطار القراءة، ويؤدي ذلك إلى اختلاف كلي من تسلسل الأحماض الأمينية. ولكن مع ذلك في الفيروسات الصغيرة، إذ تستخدم جينومها في كل اتجاه ممكن، ولذلك يوجد فيها جينات متداخلة، ولكن رغم هذا تبقى الشفرات غير متداخلة.

5. عديمة الفاصلة Comma-less: إذ إن الشفرات تمثل تركيب مستمر بدون فواصل.

6. الترافق الخطي بين الجين والنتائج Colinearity of gene and product: أي وجود تطابق خطي في التسلسل القاعدي في الجين والمRNA المستنسخ منه (بعد نضج وجاهزية هذا mRNA) مع تسلسل الأحماض الأمينية في البروتين.

فرضية تذبذب (اهتزاز) كريك

Crick's wobble (shaking) hypothesis:

إن انخفاض التخصص في الموقع الثالث للشفرة الوراثية يُطلق عليه انحلال القاعدة الثالثة (Third base degeneracy) أو ظاهرة التذبذب (Wobbling phenomenon)، وذلك لأنها لا تخضع إلى القانون الدقيق للتكامل القاعدي. إن ذلك يُمكن tRNA واحد ذو شفرة مضادة (Anticodon) خاصة من التكامل مع بعض الشفرات لنفس الحامض الأميني، ولتقليل تأثيرات الطفرات أيضاً.

إن الشفرة المضادة الموجودة على tRNA تشخص عدد من الشفرات المرادفة (Synonym codons) لحامض أميني واحد، والتي تختلف عند القاعدة الثالثة. إن mRNA و tRNA يترافقان بأسلوب متوازٍ متعاكسين ويُقرأان بالاتجاه 5' → 3'، لذلك فإنه إذا كانت القاعدة الأولى للشفرة المضادة C فإنها سوف تتكامل مع G في الموقع الثالث

للشفرة، وإذا كانت U فإنها تتكامل مع G أو A في الموقع الثالث للشفرة، وإذا كانت G فإنها تتكامل مع C أو U في الموقع الثالث للشفرة، ولكن إذا كانت إينوسين (Inosine) I فإنها تتكامل مع A أو C أو U في الموقع الثالث للشفرة. فعلى سبيل المثال تتكامل شفرتي الأرجنين AGA و AGG مع الشفرة المضادة نفسها UCU، كما أن الشفرات الثلاث للجلايسين GGU و GGC و GGA تتكامل مع الشفرة المضادة نفسها CCI.

تصنيع البروتين Protein synthesis:

البروتينات عبارة عن بوليمرات من الأحماض الأمينية والتي يتم تحديدها بواسطة mRNA، ويتم تصنيعها في السايوبلازم من خلال الريبوسومات الواقعة على الشبكة الإندوبلازمية أو الحرة أو التي تقع في داخل المايكوندريا. هنالك أنواع متباينة من البروتينات ذات وظائف وتركيبات مختلفة بسبب تسلسل الأحماض الأمينية في متعدد الببتايد المكوّن له. هذا وإن أي بروتين مُنتج في خلية معينة يتم بالاعتماد على جين واحد أو أكثر.

تتضمن عملية تصنيع البروتين أربع خطوات:

1. تنشيط الأحماض الأمينية Activation of amino acids.
2. البدء Initiation.
3. الاستطالة Elongation.
4. الإنهاء Termination.

متطلبات تصنيع البروتين Requirements for protein synthesis:

هنالك مجموعة من المتطلبات الضرورية لعملية تصنيع البروتين، وهي الأحماض الأمينية و tRNAs (31 نوع) و mRNA وإنزيمات الـ Aminoacyl-tRNA synthetases والريبوسومات وبعض عوامل البروتين والـ ATP والـ GTP للطاقة. وفيما يلي المراحل الأربع لعملية تصنيع البروتين:

1. تنشيط الأحماض الأمينية Activation of amino acids:

يتم تنشيط الحامض الأميني بواسطة إنزيم الـ Aminoacyl-tRNA synthetases المتخصص بربط حامض أميني خاص مع tRNA خاص كآتي:



إن مجموعة $\alpha - \text{COOH}$ للحامض الأميني ترتبط مع مجموعة $3' - \text{OH}$ للأدينين لذراع الاستقبال (Acceptor arm) للـ tRNA (أي أنه $3' - \text{ACC}$).

2. البدء Initiation:

تتطلب خطوة البدء لتصنيع البروتين تمييز الـ mRNA للترجمة بواسطة الرايوسومات. كما أن متطلبات هذه الخطوة هي:

a. Aminoacyl - tRNA.

b. الرايوسومة.

c. mRNA.

d. ATP و GTP.

e. على الأقل 10 عوامل بدء (في حقيقيات النواة) Eukaryotic initiation factors (eIFs).

A. تكوين معقد سابق البدء 43S

Formation of the 43S preinitiation complex:

i. يعمل عامل البدء eIF1 لحقيقيات النواة (Eukaryotic initiation factor-1)

على تفكيك الرايوسومية الكاملة إلى وحداتها الثانوية 40S و 60S ثم يعمل عامل البدء eIF3 على منع إعادة اتحاد تلك الوحدات الثانوية.

ii. إن الـ Aminoacyl - tRNA (نوع met-tRNA) يتداخل مع عامل البدء eIF2 المرتبط مع GTP ليتمكن من ربط معقد الـ 40S-eIF1-eIF3 ليعطي معقد سابق البدء 43S.

B. تكوين معقد سابق البدء 48S

Formation of the 48S preinitiation complex:

- i. يرتبط عامل البدء eIF4 مع قلنسوة (Cap) mRNA ويُشّطه للارتباط مع معقد سابق البدء 43S لتكوين معقد 48S مع تحليل ATP إلى $Pi+ADP$.
- ii. يعمل هذا المعقد على مسح (تفتيش) mRNA للبدء بـ AUG، إذ إن AUG يمثل في الغالب شفرة البداية عند الطرف 5' مع تسلسل خاص يحيط بها، لذلك فإن الشفرة المضادة للـ tRNA - Aminoacyl تجلب للارتباط مع شفرة بدء الترجمة في mRNA. إن البروتين المُصنَّع حديثاً دائماً يبدأ بالميثيونين (في بدائيات النواة يكون Formyl-methionine) حينها يكون الطرف N-terminal الحامض الأميني طالما أن الترجمة تبتدئ دائماً عند AUG.

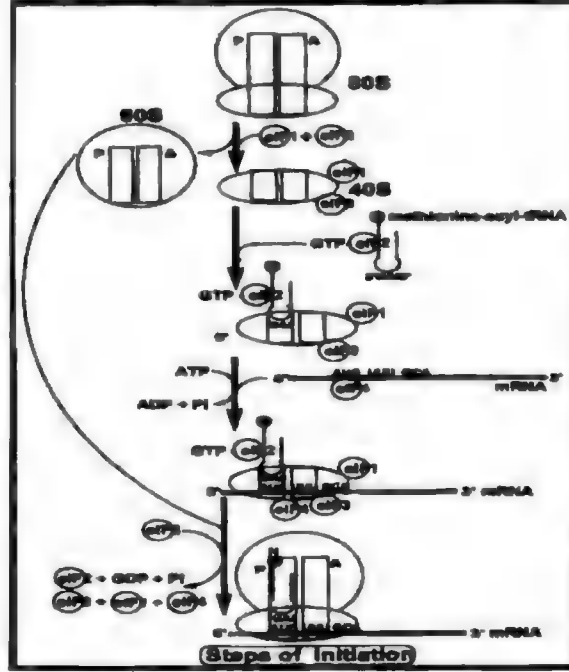
C. تكوين معقد البدء 80S

Formation of the 80S preinitiation complex:

- يعمل عامل البدء eIF5 على تحليل GTP الواقع على eIF2 إلى $Pi+GDP$ وينشط ارتباط معقد سابق البدء 48S مع الوحدة الثانوية 60S مع تحرير عوامل البدء 1 و 2 و 3 و 4. ويوضح الشكل (2 - 25) خطوات مرحلة البدء المشار إليها سلفاً.
- تحتوي الرايوسومة الكاملة على موقعين ارتباطيين للـ Aminoacyl-tRNA وهما موقع P (Peptidyl site) وهو الموقع المتقدم للـ Aminoacyl-tRNA الذي يحمل أحد الأحماض الأمينية أو حوامض أمينية أكثر. وموقع A (الموقع التالي للـ Aminoacyl-tRNA). إن أول Aminoacyl-tRNA حامل لأول حامض أميني في سلسلة متعدد الببتايد أوتوماتيكياً سوف يقع عند الموقع P، والـ Aminoacyl-tRNA التالي يدخل عند الموقع A.

هذا وعندما تكون الخلية تحت ظروف إجهاد تجعلها غير قادرة على تصنيع البروتين، مثل فقدان الأحماض الأمينية أو الجلوكوز أو الحرمان من عوامل النمو أو ارتفاع الأوزمولية (Hyperosmolality) أو الصدمة الحرارية (Heat shock)، فإن

eIF2 يخضع إلى الفسفرة التثبيطية بواسطة إنزيمات Kinases خاصة لمنع تكوين معقد سابق البدء 43S وبالتالي عدم تصنيع البروتين.

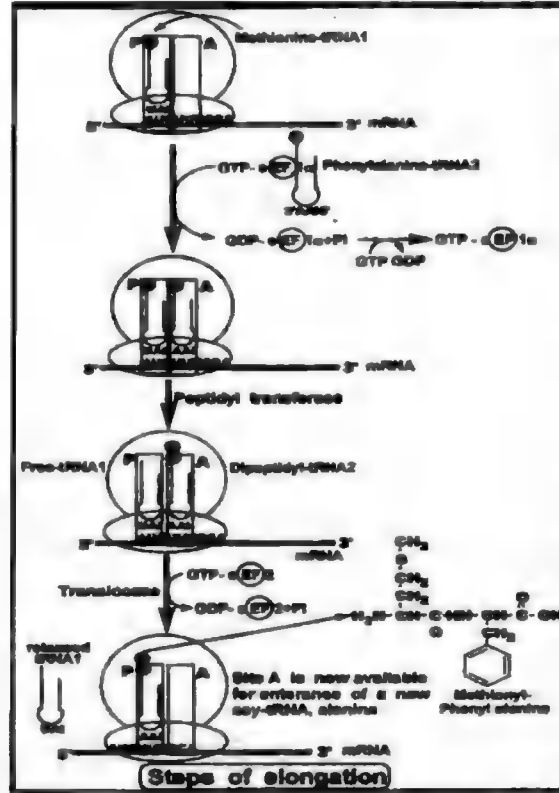


شكل (2 - 25). خطوات مرحلة البدء

3. الاستطالة Elongation:

- يرتبط عامل الاستطالة $eEF1\alpha$ (Elongation factor 1α) مع Aminoacyl-tRNA مع تحلل GTP إلى $GDP + Pi$ لتكوين معقد، وهذا المعقد يسمح للـ Aminoacyl-tRNA للدخول إلى الموقع A للرايوسومة مع تحرير عامل $eEF1\alpha$.
- إن مجموعة $\alpha - NH_2$ للأحماض الأمينية الجديد ترتبط مع مجموعة $\alpha - COOH$ للحمض الأميني الأول (Met) مع انتقال كل السلسلة الببتيدية إلى tRNA عند الموقع A بواسطة إنزيم الـ Peptidyl transferase (الـ 28S ribozyme) للوحدة الثانوية (60S) مع تحرير tRNA الحر عند الموقع P.
- يعمل عامل الاستطالة 2 ($eEF2$ وإنزيم الـ Translocase) على تغيير الموقع لكل المعقد مع Peptidyl-tRNA المتكون حديثاً لمسافة شفرة واحدة على طول mRNA.

بالانحاج 5' إلى 3'. إن عملية تغيير الموقع تحتاج إلى التحلل المائي للـ GTP إلى GDP+Pi وتكوين موقع A جديد فارغ، وذلك لدخول Aminoacyl-tRNA جديد، ولتمييز الشفرة الجديدة وهكذا. ولهذا فإن السلسلة الببتيدية المتعددة تزداد حامضاً أمينياً في كل مرة (شكل 2 - 26).



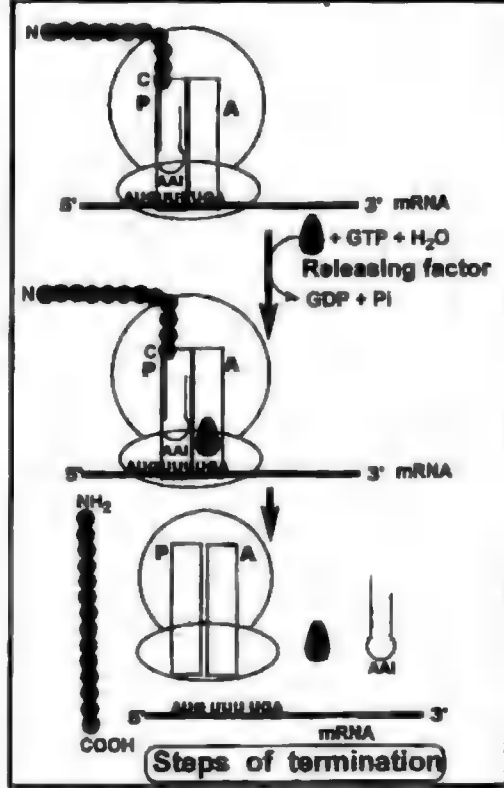
شكل (2 - 26). خطوات مرحلة الاستطالة

4. الإنهاء Termination:

عندما تظهر شفرة إنهاء (Termination codon) في mRNA عند الموقع A، فإنه لا يمكن لأي tRNA من تمييزها، في حين يتم تمييزها بواسطة عوامل التحرر eRFs (Releasing factors).

يعمل عامل التحرر على تنشيط إنزيم peptidyl transferase لتحليل وتحرير السلسلة الببتيدية الواقعة على tRNA عند الموقع P ولتحرير tRNA

ثم mRNA وتفكك الريبوسومة 80S. وهذا يتطلب التحلل المائي للـ GTP إلى GDP+Pi (شكل 2 - 27).



شكل (2 - 27). خطوات مرحلة الإنهاء

إن معدل تصنيع البروتين لا يتم التحكم فيه فقط بواسطة معدل الاستنساخ الجيني (Gene transcription)، بل أيضاً بواسطة معدل الترجمة (Rate of Translation). فعلى سبيل المثال mRNA للفرتين (Ferritin) يكون بروتين رابط للحديد Iron-binding protein. فعندما يزداد الحديد في الخلايا المخاطية (Mucosal cells) يرتبط الحديد مع البروتين المنظم بالحديد (iron-regulated protein) الذي يعمل على تغطية mRNA للفرتين ويمنعه من الترجمة ويقلل من عمره النصفى. وعلى العكس من ذلك، عندما ينخفض محتوى الحديد المخاطي، فإن

البروتينات المنظمة بالحديد تتفكك تاركة mRNA الفرتين الحر جاهزاً للترجمة إلى فرتين، والذي يرتبط مع الحديد ويسهل من عملية امتصاصه.
التحويلات التي تطرأ على البروتينات بعد الاستنساخ

Post-translation modification of proteins:

وتتضمن تلك التحويلات ما يأتي :

- a. الطي النهائي (الذي يمنع من خلال العمليات الحافظة لمرافقة الجزئية حتى انتهاء عملية الاستنساخ).
- b. التنشيط بواسطة التحلل المائي لببتيد إضافي (قبل - سوابق - بروتينية (Pre-pro-proteins).
- c. عملية إضافة السكر (Glycosylation) التي تحدث في الشبكة الإندوبلازمية ومعقد جولجي.
- d. عملية إضافة الهيدروكسيل (Hydroxylation) للبرولين واللايسين كما هو الحال في الكولاجين.
- e. عملية إضافة الفسفور (Phosphorylation) للتايروسين أو السيرين أو الثريونين.

تأثير المضادات الحيوية على عملية تصنيع البروتين

Effect of antibiotics on protein synthesis

يوجد عدد من المضادات الحيوية وبعض السموم التي تعمل بشكل انتقائي على تثبيط تصنيع البروتين في البكتريا، وذلك بسبب الاختلاف بين النظام الريبوسومي في حقيقيات النواة وبدائيات النواة.

1. Aminoglycosides مثل Streptomycin والـ Gentamycin والـ Amikacin ، والتي ترتبط مع 23S rRNA وتعيق ارتباط mRNA مع الريبوسومة.
2. Tetracyclines والتي تمنع ارتباط Aminoacyl-tRNA مع الموقع A.
3. Chloramphenicol يعمل على تثبيط الـ Peptidyl transferase.

4. Puromycin يمتلك تركيباً مشابهاً للـ Tyrocy-tRNA ويسبب تحرراً للبيتيد قبل نضجه في كل من حقيقيات وبدايات النواة.

5. Cycloheximide يعمل على تثبيط إنزيم الـ Peptidyl transferase في حقيقيات النواة فقط.

6. السم الخارجي لبكتريا الخناق (Diphtheria exotoxin) يعمل على تثبيط وظيفة الـ ADP-ribosylates eEF2.

هذا وقد تحدث تحورات اختلالية على مستوى التركيب الثانوي للبروتين، مؤديةً بذلك إلى حدوث بعض الأمراض الخطيرة والتي نود أن نُشير إلى مثال عليها هنا في نهاية هذا الفصل، تحت العنوان الآتي:

مرض جنون البقر (الاعتلال الدماغى الأسفنجي):

بتاريخ 20 / 3 / 1996 أعلنت الحكومة البريطانية عن وجود مرض دماغي جديد أدى إلى وفاة 10 حالات بعمر الشباب من البريطانيين، وأن الضحايا تمت إصابتهم من خلال أكل لحوم الأبقار المصابة. وقد عُرف باسم مرض جنون البقر (Mad cow disease) أو الاعتلال الدماغى الأسفنجي البقري (BSE Bovine Spongiform Encephalopathy) والذي يعمل على حدوث تحطّم وخراب بطيء في خلايا الدماغ، حتى يكتسب المظهر الشبيه بالإسفنج المليء بالأخاديد والتجاويف، وغالباً ما يكون قاتلاً. كما أن الدراسات الحديثة أثبتت بأن مرض BSE ونوع جديد من المرض يُصيب الإنسان يُرمز له nvCJD (Creutzfeldt - Jacob Disease) يكونان مُتشابهان على المستويين المرضي والجزيئي مع احتمالية عالية لحدوث المرض نفسه.

أدى مرض جنون البقر إلى هياج عارم في أوروبا وخسارة بحدود 8.9 بليون دولار في تجارة اللحوم البريطانية، كما أن الاتحاد الأوروبي أعدم وأحرق ما يقارب 4.7 مليون بقرة، وبكلفة بلغت أكثر من 12 بليون دولار لتعويض الفلاحين.

لقد ظهر BSE و nvCJD حديثاً في فرنسا وبلدان أوروبية أخرى وجنوب أفريقيا. هذا وقد مات ما لا يقل عن 90 مواطن أوروبي بسبب nvCJD. فضلاً عن

ذلك فإن علماء الأوبئة قدروا ما بين 10000 و 500000 حالة من الإصابة بالـnvCJD قد تظهر في العقدين القادمين.

إن BSE و nvCJD وأنواع أخرى من CJD كلها أفراد لمجموعة من الأمراض التي تُصيب الجهاز العصبي، فتسبب اعتلالات دماغية أسفنجية، تصيب الحيوانات (BSE) والإنسان (CJD و nvCJD). وفي هذه المجموعة من الأمراض تشابه أنسجة الدماغ المصاب بالمظهر الأسفنجي الذي تشوبه المخلفات البروتينية. ويفقد ضحايا المرض الوظيفة الحركية، يلي ذلك العته ثم الموت أخيراً.

هنالك اختلافان بين CJD و nvCJD في فترة الحضانة والأعراض، إذ تكون فترة الحضانة للـCJD بين 20 - 30 سنة، في حين يمتلك nvCJD فترة حضانة أقل، لذلك فإن ضحاياه يُظهرون سرعة في الانحطاط والعته، فضلاً عن فقدان التوافق الحركي في مراحل مبكرة من المرض، كما أن nvCJD يرتبط مع استهلاك لحوم المواشي الملوثة بالـBSE بشكل واضح. وليس كذلك بالنسبة للـCJD، فضلاً عن ذلك يتشر CJD في الناس فوق عمر 55 سنة، في حين أن nvCJD قد ولحظ في أولئك الأقل من هذا العمر، بل وحتى في أعمار صغيرة كالسنوات العشر المبكرة.

لقد نشأ عدد من حالات CJD بشكل تلقائي وعشوائي بمعدل 1 لكل مليون في السنة على مستوى العالم، ويورث أحد أشكال CJD وهو أقل شيوعاً، بيئة جسيمة سائدة، ولكن الأشكال الانتقالية تكون أكثر غرابة.

يمكن أن ينتقل CJD من خلال زراعة القرنية أو الأنسجة العصبية أو بواسطة حقن هرمون النمو (Growth hormone) المشتق من الغدد النخامية للإنسان. هذا وينتقل مرض Kuru وهو مشابه للـCJD، وكان قد أصاب قدماء البشر في نيو غينيا من خلال طقوس أكل لحوم البشر عندهم. تستهدف الحيوانات حالات العدوى للاعتلالات الدماغية الأسفنجية، كمرض Scrapie (في الماعز والأغنام) ومرض Chronic wasting disease (في الأيل والضبّي)، وكذلك مرض BSE، وتحصل الإصابة بأمراض Kuru و BSE و Scrapie من حيوان إلى حيوان بواسطة أكل بقايا الحيوانات المصابة وخصوصاً الأنسجة العصبية.

إن تفشي وبائية BSE في بريطانيا حدث بسبب استخدام مخلفات الأغنام والأبقار المصابة (بعد معاملتها) كمصدر بروتيني في علائق الماشية، لذلك منعت الحكومة البريطانية في سنة 1998 استخدام مخلفات الأبقار والأغنام في تغذية المواشي الأخرى، وبالفعل قل انتشار المرض بعد هذا الإجراء.

وفي خطوة حديثة تكاد تكون مشابهة، أصدر الاتحاد الأوروبي حضراً مؤقتاً على استخدام الأغذية ذات المحتوى الحيواني في كل العلائق الحيوانية، ومع ذلك لم يُطبق هذا الإجراء.

أما في الولايات المتحدة الأمريكية وكندا، فالقوانين لازالت تسمح للحيوانات غير المجترّة باستهلاك الأغذية المحتوية على منتجات لحوم المجترات، وتسمح للحيوانات المجترّة باستهلاك العلائق المحتوية على لحوم حيوانات غير مجترّة، وكذلك بعض المنتجات العرضية للحيوانات المجترّة مثل الدم والجيلاتين والدهون. ولكن هذه القوانين قد تتغير، إذ إن الدراسات الحديثة تقترح إمكانية انتشار BSE بين الأبقار والخنازير والطيور والحيوانات الأخرى، أو من الأبقار للمعجول.

لقد منع القسم الزراعي الأمريكي استيراد المواشي أو اللحوم المنتجة في البلدان التي ظهرت فيها إصابات BSE. وحالياً لم تُسجل أي حالة من BSE في الولايات المتحدة الأمريكية، وبسبب اعتبارات كون nvCJD قد ينتشر بوساطة نقل الدم فإن كندا والولايات المتحدة منعت نقل الدم من أشخاص أمضوا 6 أشهر في بريطانيا بين الأعوام 1980 و 1986.

وبعد سنوات مضيئة من البحث والدراسة حول الاعتلال الدماغى الأسفنجي، أنجز العلماء خطوات قيمة في التحري عن ماهية هذا المرض، خصوصاً وأنه من الصعب دراسته، لأنه لا بُد من حقن الدماغ المصاب في أدمغة حيوانات تجريبية أخرى، ويحتاج تطوّر المرض إلى أشهر أو سنوات، وما يزيد الأمر تعقيداً كون العامل المرضي ليس فيروساً أو بكترياً، وأن الحيوانات المصابة لا تكون تجاهه أية أجسام مضادة.

هذا ولم يتم التوصل إلى علاج للمرض لحّد الآن. والطريقة الوحيدة لجعل التشخيص دقيقاً هو فحص أنسجة الدماغ بعد الموت. إن العامل المرضي لا يتأثر

بالإشعاع وإنزيمات Nucleases التي تحطّم الأحماض النووية، ومع ذلك فإنه يتحطّم بواسطة بعض العوامل التي تحلّل أو تحوّر البروتينات.

في أوائل الثمانينيات قام العالم الأمريكي Stanley Prusiner بتنقية العامل المرضي، واستنتج بأنه يتكوّن من بروتين فقط، واقترح بأن مرض Scrapie ينتشر من خلال جسيمات بروتينية معدية تدعى (Prion). ولكن الفرضية التي بُنيت على تلك النتائج كانت قد رُفِضت من قِبَل أغلب العلماء طالما أن الفكرة حول العامل المرضي هو اشتراط احتوائه على DNA أو RNA كمواد وراثية قابلة للتوريث. مع ذلك، قدّم Prusiner وغيره أدلة تُسند فرضية البرايون، وأن المرض يمكن أن ينتقل بجسيمات مرضية غير وراثية.

إذا كان البرايون يتركب من بروتين فقط، فكيف يسبب المرض؟ قد يكون الجواب غريباً، فالبروتين الذي يتركب منه البرايون (PrP) هو نسخة محوّرة من البروتين الطبيعي المصنوع في الخلايا العصبية، وموجود في أدمغة كل الحيوانات البالغة. كما أن الاختلاف بين PrP الطبيعي و PrP برايون يتمثّل في التراكيب الثانوية للبروتين، إذ ينطوي PrP الطبيعي غير المعدي بهيئة حلزون ألفا (α -helices)، في حين أن PrP البرايون المعدي ينطوي بهيئة صفائح بيتا (β -sheets). وعندما تتلامس جزيئة PrP طبيعية مع جزيئة PrP برايون، فإن البروتين الطبيعي يُعاد طيه بطريقة ما، ويتحوّل إلى PrP مُمرض غير طبيعي، وحالما يتحوّل PrP الطبيعي إلى PrP غير طبيعي، تنتشر الأشكال المُميتة إلى جزيئات PrP الطبيعية المجاورة، وتستمر العملية بهيئة تفاعل مُتسلسل، وهنا تكمن إحدى التحوّلات الحرجة للخطورة.

إن PrP الطبيعي هو عبارة عن بروتين ذائب يتحطّم بسهولة بواسطة الحرارة والإنزيمات المُحلّلة للبروتينات، ولكن PrP المُمرض لا يذوب في المنظّفات، ويقاوم الحرارة وإنزيم الـ Protease المُحلّل للبروتينات، وتقريباً غير قابل للتخطيم، بسبب تلك التغيرات التركيبية. وعليه تُعدّ اعتلالات الدماغ الأسفنجي أمراض من بروتينات ذات تركيب ثانوي.

وفي خضم ذلك فإن كثيراً من التساؤلات المهمة تحتاج للدراسة، منها: ما مدى التلوث بالـ BSE في المحتوى الغذائي العالمي؟ وكم عدد البشر المصابين بالمرض nvCJD والذين لم تظهر عليهم الأعراض لحد الآن؟ وهل يمكن للبشر أو الحيوانات أن تكون حوامل لمرض البرايون وغير واضحة الأعراض؟ وهل بالإمكان تواجدها البرايونات في أجزاء أخرى من الجسم فضلاً عن أماكن الإصابة الطبيعية المتمثلة بالدمغ والجبل الشوكي، وإذا كان كذلك، هل يستطيع nvCJD الانتقال من خلال نقل الدم، أو من الأم إلى الجنين، أو بواسطة الأدوات الجراحية وأدوات أطباء الأسنان المعقمة؟ هل نستطيع تطوير اختبارات تشخيصية وعلاجات للـ BSE والـ nvCJD؟ وهل نحن على مقربة من نهاية قصة الـ BSE أم بدءنا الآن؟

الفصل الثالث

مستويات تنظيم الـ DNA في الكروموسوم

الفصل الثالث

مستويات تنظيم الـ DNA في الكروموسوم

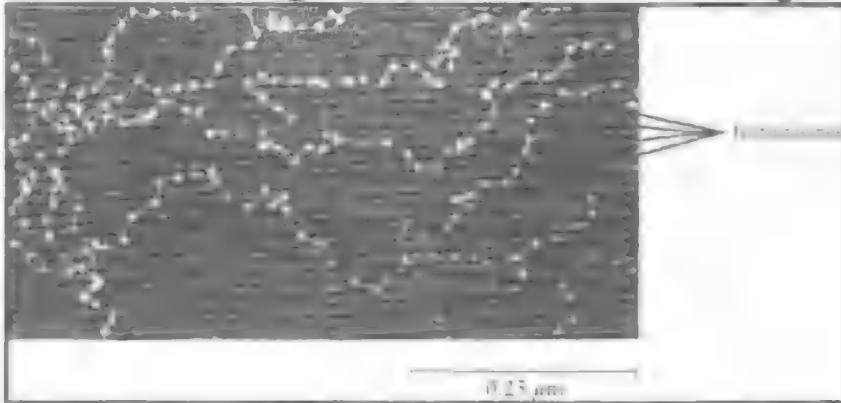
إن تسلسل جينوم الإنسان تتخلله بعض الشغرات التي يتشكل الغالبية منها من الهيتروكروماتين ذو التكرار والتكثف العالي والذي يحتوي على تسلسلات مشفرة قليلة.

أن الحجم الكلي المُخَمَّن لجينوم الإنسان هو 3200 مليون ($10^9 \times 3.2$) زوج قاعدي للـ DNA أو 3.2 كيكا زوج قاعدي (Gigabase Pairs، $10^9 \text{ bp} = 1 \text{ Gbp}$)، ومنه 2.95 Gb يكون هيتروكروماتين. وإذا تصورنا أن الصفحة النموذجية لأي كتاب تحتوي تقريباً 3000 حرفاً، وعليه فإن جينوم الإنسان سيملاً ما يقارب مليون صفحة. وكما هو معروف بأن أغلب الـ DNA للكائنات الراقية هو غير مُشَفَّر ويتضمن المناطق بين الجينية (Intergenic regions) والأنترونات (Intons) والتسلسلات المتكررة (Repetitive sequences). وهناك ما يقارب 28٪ من DNA الإنسان يتم استنساخه بهيئة RNA، ولكن طالما أن النسخ الأولية لهذا الـ RNA تتضمن أنترونات، فإنه مجرد 1.25٪ من التسلسل هي في الحقيقة تُشَفَّر إلى بروتينات. وبالمعدل فإن الأنترونات تكون أطول في DNA الإنسان مقارنةً بالكائنات الأخرى. وفي جينوم الإنسان يوجد كلاً من المناطق الغنية بالـ A – T والغنية بالـ G – C، ومما يلفت النظر بأن التسلسلات الغنية بالـ G – C تمتلك كثافة جينية أعلى، وتكون فيها الأنترونات أقصر، ولكن أهمية ذلك غير معروفة. كما أن أكثر من نصف جينوم الإنسان يتضمن تسلسلات متكررة (Repeated sequences).

لقد أظهرت دراسات المجهر الإلكتروني بأن الكروماتين المعزول يتألف من وحدات تركيبية متكررة يُطلق عليها النيوكليوسومات (Nucleosomes) والتي ترتب بمسافات على طول الـ DNA مثل خرزات (Beads) المسبحة (شكل 3 – 1). إن كل

نيوكليوسومة تتألف من تجمع ثمان (Octamer) هستونات (Histones): كريات بروتينية موجودة في حقيقيات النواة فقط (جدول 3 - 1)، بحيث يلتف الـ DNA على هذه الثمان هستونات كما يلتف الخيط على بكرة الخياطة لمسافة تقارب 146 زوج قاعدي لكل نيوكليوسومة (شكل 3 - 2). يتألف التجمع الثماني من اثنين لكل من الهستونات H2A و H2B و H3 و H4. ويكوّن ذلك محور اسطواني بحدود 5.5×10 نانومتر، بحيث يلتف حوله الـ DNA بشكل يساري فائق الالتفاف (Left-handed superhelix) بما يقارب لفتين تقريباً. ويُعتقد بأن الهستونات H3 و H4 تُشكّل مركز المحور، ولذلك فإنها تترافق مع التفاف العروة الرئيسة للـ DNA، في حين أن الهستونات H2A و H2B ترتبط مع الـ DNA عند كل من نهايتي العروة.

تفصل النيوكليوسومات الواحدة عن الأخرى بواسطة الـ DNA الفاصل أو الرابط (Spacer or linear DNA)، إذ إن معاملة الألياف الكروماتينية بإنزيم الـ Deoxyribonuclease يؤدي إلى تقطيع الـ DNA الفاصل وتحرير النيوكليوسومات الحرة. وعند البداية فإن كل نيوكليوسوم متحرر بهذه الطريقة يمتلك ما يُقارب 200 زوج نيوكليوتيدي، ولكن استمرار عملية التقطيع (الهضم الإنزيمي) يؤدي إلى تحلل الـ DNA الفاصل بشكل كامل تاركاً جسيمة المحور (Core particle) المولّفة من الثماني الهستوني مع الـ DNA الملتف عليه الذي يُشكّل 146 زوج قاعدي.



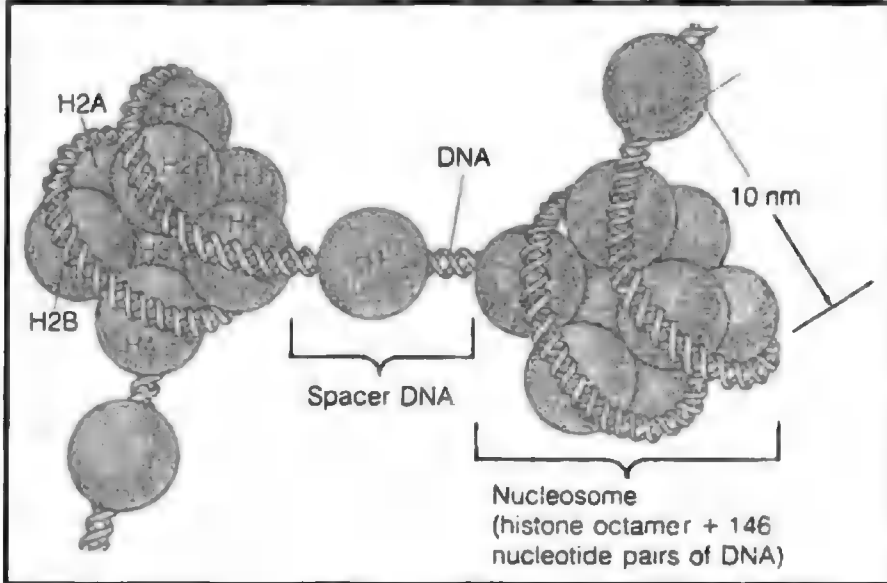
شكل (3 - 1). النيوكليوسومات

تظهر كتراكيب شبيهة بخرزات المسبحة على طول الألياف الكروماتينية، مُحضرة من خلايا الدم الحمراء للدواجن، ومُصورة بالمجهر الإلكتروني

جدول (3 - 1). خصائص المستونات

الصنف	التركيب الكيميائي	الوزن الجزيئي	التغاير بين الأنواع
H1	غني باللايسين Lysine-rich	21000 - 19500	متغاير بشكل كبير ^(*)
H2B, H2A	غني باللايسين بشكل بسيط Slightly lysine-rich	17000 - 13000	متغاير بشكل معتدل
H4, H3	غنية بالأرجنين Arginine-rich	15000 - 11500	غير متغايرة بشكل كبير ^(*)

^(*) لتوضيح الاختلاف في التباين في المستونات، على سبيل المثال هناك 40 اختلاف في تسلسل الأحماض الأمينية للـ H1 بين العجل وذبابة الفاكهة، ولكن هناك اختلافين فقط في تسلسل الأحماض الأمينية للـ H4 بين العجل ونبات البازلاء.



شكل (3 - 2). تركيب النيوكليوسوم

إن عدد الأزواج النيوكليوتيدية للـ DNA الفاصل بين النيوكليوسومات المتعاقبة هو بمعدل يُقارب 50 - 60 bp، ولكن من الممكن أن يتغير اعتماداً على مصدر

الـDNA، فهو يتراوح من عدد قليل بحدود 20 زوج نيوكليوتيدي إلى ما يقارب 100 زوج نيوكليوتيدي. كما أن أهمية هذا التباين غير معروف، ومن غير المعروف تماماً لماذا هذا التنظيم في المسافات بين النيوكليوسومات على طول الـDNA، ولماذا تترافق الهستونات بشكل تفضيلي مع تسلسلات نيوكليوتيدة خاصة.

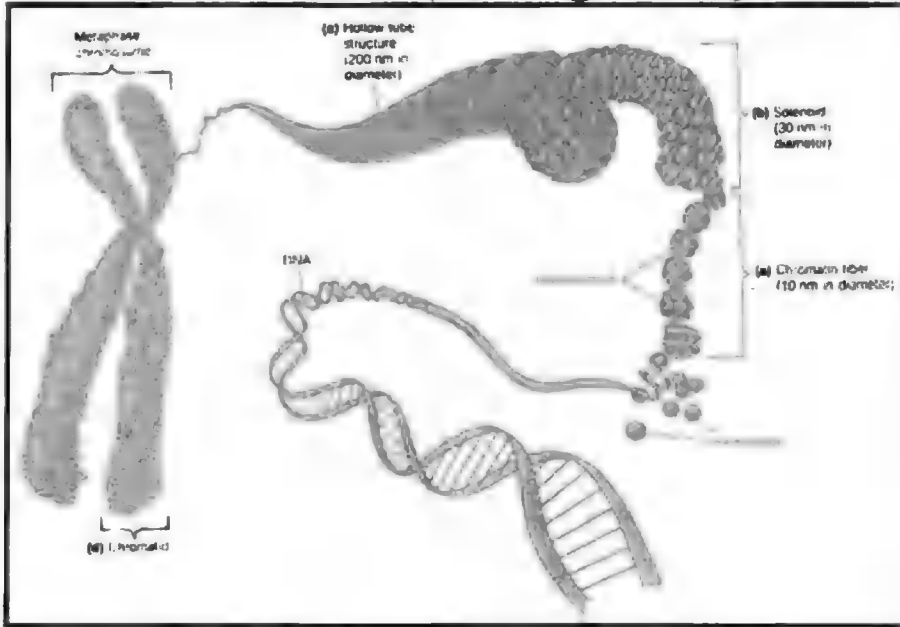
هذا ولا يُشكّل هستون H1 جزء من تركيب النيوكليوسومة، ولكنه بدلاً من ذلك يترافق مع الـDNA الفاصل بين النيوكليوسومات، ولذلك يُعتقد بأنه يعمل على ضم النيوكليوسومات المتجاورة بالقرب من بعضها لتكوين الليف الكروماتيني (Chromatin fiber) (شكل 3 - 3 - a). إذ يبلغ سمك هذه اللياف ما يقارب 10 نانومتر، وهي تُشكّل العنصر التركيبي الرئيسي لكروموسومات حقيقيات النواة. ونحت الظروف الطبيعية يُكوّن الليف الكروماتيني التفاف حلزوني يُسمّى السولينويد (Solenoid) بسمك يقارب 30 نانومتر. إن كل لفّة من التفافات السولينويد تتألف من ست نيوكليوسومات تقريباً (شكل 3 - 3 - b). يلعب H1 دوراً مهماً في استقرارية تركيب السولينويد، إذ إن غيابه يؤدي إلى فقدان هذا التنظيم. يلتف السولينويد هو الآخر مرة أخرى ليكوّن مستوى أكثر تعقيداً يُسمّى الأنبوب المجوّف (Hollow tube) بحدود 200 نانومتر (شكل 3 - 3 - c). في الخلايا التي لا تكون في حالة انقسام، فإن التكتّف الكروموسومي يقل ويميل للارتخاء.

وحالما تتحضّر الخلايا للدخول في الانقسام، تصبح كروموسوماتها أكثر تكتّف، إذ إن هذا التكتّف لا يزال يتضمّن مستويات التفاف عالية، التي فيها الأنابيب المجوّفة بقطر 200 نانومتر الموجودة في الطور البيني (Interphase) (بين الانقسامات) سوف تكوّن الكروماتيدات بقطر 600 نانومتر الموجود في كروموسومات الطور الاستوائي (Metaphase) (شكل 3 - 3 - d).

يتم تقدير امتداد (ارتخاء) الـDNA الملفوف كمياً من خلال نسبة الترميز (Packing ratio) والتي تُعرّف بأنها طول جزيئة الـDNA الخطي (Linear DNA) مقسوماً على طول الكروموسوم أو الليف المُعبّئ فيه. إن الالتفاف الابتدائي للـDNA حول المحاور الهستونية للنيوكليوسومات يُقلّل الطول بمقدار 7 مرات، وأن تكوّن

السولينويد يؤدي إلى تكثف إضافي بمقدار 6 أضعاف، لذلك تكون نسبة التزيم لتركيب السولينويد محدود 42. إن التفاف السولينويد في الأنابيب ذات القطر 200 نانومتر تُكثف طول الـ DNA بمقدار 18 مرة، وهذا يجعل نسبة التزيم الكلية ابتداءً من جزيئة الـ DNA الخطي وحتى الأنبوب المجوّف للطور البيني هي محدود 750.

تكون نسبة التزيم لكروموسومات الطور الاستوائي عالية بسبب التكثيف الإضافي الذي يحدث حال دخول النواة في الانقسام. فعلى سبيل المثال يحتوي الكروموسوم النموذجي للإنسان على DNA بطول يقارب 75 ملم، ويطول يُقارب 4 أو 5 مايكرومتر في الطور الاستوائي. وعليه تتراوح نسبة التزيم الكلية بين 15000 - 20000.



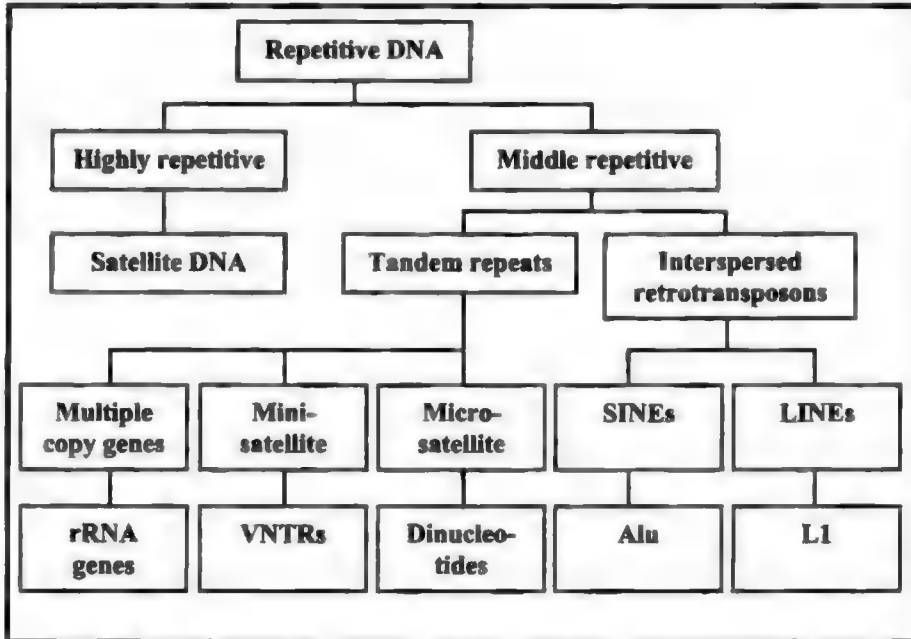
شكل (3 - 3). ترزيم النيوكليوسومات في الكروموسوم

جينومات حقيقيات النواة تُظهر تنظيم تسلسل مُعقد يتميز بالـ DNA المتكرر:

فضلاً عن النسخ المفردة من تسلسلات الـ DNA المتفرّد التي تكوّن الجينات، فهناك عدد كبير من تسلسلات الـ DNA ضمن الكروموسومات تكون متكررة في طبيعتها، وهناك مستويات مختلفة من التكرار تحدث ضمن جينوم الكائن الحي. لقد تمت دراسات عديدة ركّزت على هذه التسلسلات، وفيها وُجدت أصناف مختلفة من

تلك التسلسلات وتنظيمها ضمن الجينوم. الشكل (3 - 4) يوضح مراتب مختلفة من متكررات الـ DNA، كما يُبين بأن بعض الجينات الفعالة (Functional genes) موجودة بأكثر من نسخة (يُشار لها بالجينات متعددة النسخة Multiple copy genes). مع ذلك فإن الغالبية من التسلسلات المتكررة تكون غير جينية (Nongenic)، وفي الحقيقة فإن أغلب التسلسلات المتكررة لا يُعرف لها وظيفة معينة، وسوف نُشير هنا إلى ثلاث مراتب رئيسية:

1. الكروماتين المتباين (Heterochromatin) الموجود بصحبة السنتروميرات ويُكوّن التيلوميرات.
2. المتكررات المترادفة لكل من تسلسلات الـ DNA القصيرة والأطول.
3. التسلسلات القفّازة (المتنقلة Transposable sequences) والتي تنتشر في جينومات حقيقيات النواة.



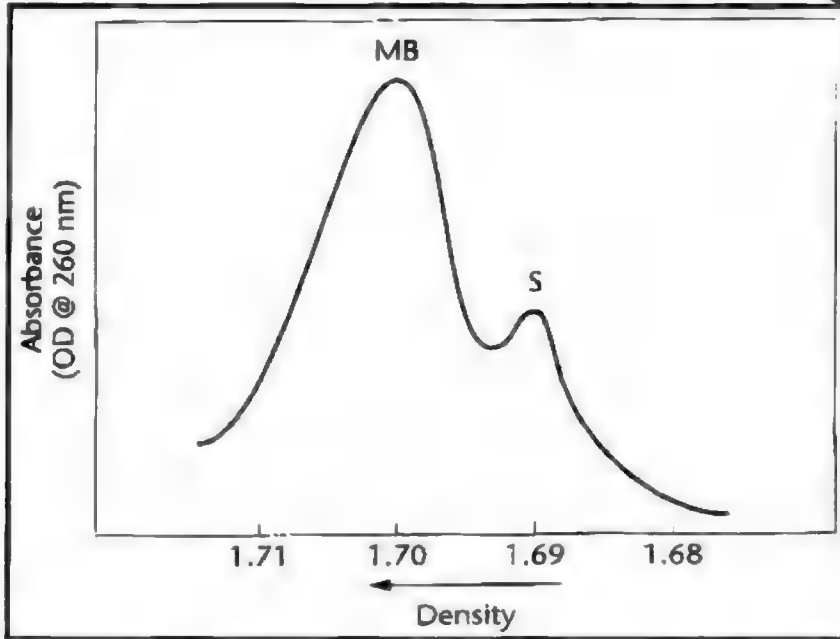
شكل (3 - 4). ملخص للمراتب المختلفة للـ DNA المتكرر

الـ DNA المتكرر و الـ DNA التتابع

Repetitive DNA and Satellite DNA

إن التركيب النيوكليوتيدي للـ DNA (يعني نسبة ازدواج $G \equiv C$ مقابل $A = T$) لنوع معين يُعكس في كثافته، والذي يمكن قياسه بالطرد المركزي متوازن الترسيب (Sedimentation equilibrium centrifugation). عندما يتم تحليل DNA حقيقيات النواة بهذه الطريقة فإن الغالبية منه يكون قمة منحني مفردة رئيسية أو حزمة بكثافة متماثلة.

مع ذلك تظهر تظهر قمة إضافية أو أكثر للـ DNA تختلف بشكل بسيط في الكثافة، مثل تلك القمة تسمى الـ DNA التابع (Satellite DNA) يمثل نسبة متغيرة من الـ DNA الكلي اعتماداً على نوع الكائن، كما هو الحال في نمط الحزمة الرئيسية والتابع للفأر المبيّن في شكل (3 - 5).



شكل (3 - 5). فصل الحزمة الرئيسية (Main band) MB والتابع (Satellite) S للـ DNA من الفأر باستخدام الطرد المركزي الفائت (Ultracentrifugation) في متدرج كلوريد السيزيوم CsCl

لقد ظلت أهمية التوابع مجهولة حتى أواسط الستينات عندما طور كل من David Kohne, Roy Britten تقنية لقياس حركات إعادة الاتحاد للـDNA، إذ أوضح الباحثان بأن نسبة معينة من الـDNA يُعاد اتحادها بسرعة أكثر من غيرها، واستنتجوا بأن سرعة إعادة الاتحاد هي ميزة لقطع DNA متعددة تتضمن تسلسلات نيوكليوتيدية متماثلة أو شبه متماثلة، وهذا أساس ما أُصطلح عليه بالـDNA المتكرر (Repetitive DNA)، وهو على العكس من DNA بدائيات النواة الذي يتمثل بتسلسلات ذات نسخ مفردة (Single-copy sequences).

عندما يوضع الـDNA التابع للتحليل بواسطة حركات إعادة الاتحاد، فإنه يقع في مرتبة الـDNA ذو التكرار العالي (Highly repetitive DNA) والذي يُعرف عنه بأنه يتكوّن من تكرار تسلسلات قصيرة لعدد كبير من النسخ. وهناك أدلة أخرى اقترحت بأن تلك التسلسلات موجودة بهيئة متكررات مترادفة تتجمّع في مناطق كروموسومية متخصصة جداً هيئة كروماتينية مُتباينة (Heterochromatic)، وهي المناطق التي تقع على خواصر السنتروميترات. وقد تم اكتشاف ذلك عام 1969، عندما قام بعض الباحثين ومنهم Mary Lou Pardue و Joe Gall بتطبيق تقنية التهجين الجزيئي الموقعي (In situ molecular hybridization) لدراسة الـDNA التابع، إذ تتضمن التقنية التهجين الجزيئي بين الأجزاء المعزولة من مجسّات DNA أو RNA معلّمة إشعاعياً (Radioactivity-labeled DNA or RNA) والـDNA المتواجد في الكروموسومات للتحضيرات الخلوية. بعد طريقة التهجين يتم التصوير الشعاعي الذاتي لتحديد موقع المناطق الكروموسومية المكملّة مع المجسّات. في تجربة Pardue و Gall أظهر أن المجسّات المُصنّعة من الـDNA التابع للفأر تهجن مع DNA المناطق السنترومية للكروموسومات في طور الانقسام (شكل 3 - 6).



شكل (3 - 6). التهجين الموقعي بين المجس المُعلّم إشعاعياً المتمثل بالـ DNA التابع والكروموسومات في طور الانقسام، إذ يلاحظ بأن الحبيبات السوداء في التصوير الإشعاعي الذاتي تحدد المناطق الكروموسومية (السنتروميترات) التي تحتوي على تسلسلات الـ DNA التابع

تسلسلات الـ DNA السنترومييري Centromeric DNA sequences

تم وصف السنتروميترات في أواخر القرن التاسع عشر كتركيب أولية في كروموسومات حقيقيات النواة، تلعب بعض الأدوار المهمة خلال الانقسام الميوزي والميوزي، فهي:

1. مسؤولة عن المحافظة على تلاصق الكروماتيدات الشقيقة قبل الطور الانفصالي (Anaphase stage)، إذ تمثل نقطة السنتروميير على طول الكروموسوم والتي فيها تبقى الكروماتيدات الشقيقة (Sister chromatids) بهيئة مزدوجة خلال المراحل المبكرة من الانقسام الميوزي والميوزي.

2. تمثل موقع تكوين الكاينيتوكور (Kinetochore)، وهي الأشكال الصفيحية البروتينية التي تنظم حول السنتروميير، وتلاصق النيبات الدقيقة المكوّنة لألياف المغزل. ولذلك فإن السنتروميترات تتوسط هجرة الكروموسومات خلال الطور

الانفصالي. هذه العملية تُعدّ ضرورية لفصل الكروماتيدات، وفي دقة توزيع الكروموسومات خلال انقسام الخلية.

إن أغلب عمليات عدم الدقة خلال الانقسام الميتوزي على أعلاها تكون أقل من $10^{-5} \times 1 - 10^{-6} \times 1$ أو خطأ واحد لكل 100000 - 1000000 انقسام خلوي. ونتيجة لذلك يفترض بشكل عام أن تحليل تسلسل الـ DNA للمناطق السنترومية يعطي بُعداً إلى آفاق مستقبلية مهمة لتلك المناطق التي أُشير إليها بالرمز CEN والتي تم تعريفها وتحديدتها في عدد من الكروموسومات.

في الإنسان واحد من أهم تسلسلات DNA التوابع المُميز، وهو ما يُسمّى بعائلة Alphoid family والموجودة بشكل أساسي في المناطق السنترومية، وهي مكونة من 171 زوج قاعدي بشكل ترادفي متكرر بشكل رأسي - ذيلي (Head-to-tail) لتشكل ما يصل إلى 3 مليون زوج قاعدي. ومثل هذا التكرار موجود في حيوانات ثديية أخرى من رتبة الرئيسيات (Primates) ذات علاقة تطورية وثيقة، مع العلم بأنه ليس تسلسل أو إعداد متكررات الـ 171 زوج قاعدي محافظ عليها. كما أن الدور الحقيقي لتلك التسلسلات ذات التكرار العالي في DNA السنترومير لا يزال غير واضح، ولكن يُعرف عنها بأنها تسلسلات لا يتم استنساخها.

تسلسلات الـ DNA الطرية (التيلوميري) Telomeric DNA sequences

هنالك أيضاً تركيب ذو أهمية كبيرة وهو التيلومير (Telomere)، يمثل جزءاً من الكروموسومات، بحيث يتواجد في نهايات الكروموسوم الخيطية. إن وظيفة التيلوميرات (كما ذكرنا في الفصل الثاني) هي إعطاء استقرارية للكروموسوم، وجعل نهايات الكروموسوم بشكل عام خاملة في تداخلها مع نهايات كروموسومية أخرى. وعلى العكس من الكروموسومات المكسورة والتي قد يُعاد اتصال نهاياتها مرة أخرى مع نهايات أخرى، فإن المناطق التيلوميرية لا تتحد مع واحدة أخرى أو مع النهايات المكسورة. ويُعتقد بأن بعض النواحي في التركيب الجزيئي للتيلوميرات يجب أن يكون متفرداً، مقارنةً مع مناطق الكروموسوم الأخرى.

هنالك نوعان من التسلسلات التيلوميرية تم اكتشافها:

1. النوع الأول: يُدعى ببساطة تسلسلات DNA تيلوميرية (Telomeric DNA sequences): تتضمن متكررات مترادفة صغيرة، وهي تلك المجموعة التي تُساهم في استقرارية وكمالية الكروموسوم. في الهدييات (Ciliate) مثل *Tetrahymena* أكثر من 50 متكرر ترادفي من تسلسلات سداسية GGGGTT موجودة. وفي الإنسان يتكرر التسلسل GGGATT لمرات كثيرة. إن تحليل هذه التسلسلات أظهر بأنها تُحافظ عليها بشكل كبير خلال التطور، وهذا يعكس الدور الحرج الذي تلعبه في الحفاظ على كمالية الكروموسومات.

2. النوع الثاني: وهي التسلسلات المصاحبة - التيلوميرية - associated Telomeric sequences: وهي تتكوّن كذلك من تسلسلات متكررة، وتكون مجاورة وضمن التيلومير. هذه التسلسلات تتغير بين الكائنات، وأهميتها لازالت غير معروفة.

إن تضاعف التيلومير يتطلب إنزيمًا متميزًا يحتوي على RNA يُسمى Telomerase. وبغيابه فإن DNA في النهايات الكروموسومية يصبح أقصر خلال كل تضاعف. في الكائنات متعدّدة الخلايا مثل الإنسان، فإن التيلوميرات مهمة في الخطوط الخلوية الجرثومية (Germ-line cells)، ولكنها غير فعّالة في الخلايا الجسمية، كما أن عملية تقصير الكروموسوم تُعدّ جزءاً من الآليات الطبيعية في شيخوخة الخلايا. في الخلايا السرطانية البشرية التي تصبح خالدة، يبدو أن التحوّل إلى حالة ورمية خبيثة يتطلب تنشيط إنزيم التيلوميريز لكي يتم تجاوز الشيخوخة المرافقة للقصير الكروموسومي.

التسلسلات متوسطة التكرار: VNTRs والمتكررات ثنائية النيوكليوتيدات

Middle repetitive sequences: VNTRs and Dinucleotide repeats

بالإضافة إلى الـ DNA عالي التكرار الذي يُشكّل 5% من جينوم الإنسان و 10% من جينوم الفأر، توجد مرتبة ثانية بما يسمى بالـ DNA متوسط التكرار (Middle or moderately repetitive DNA) والذي يتم تشخيصه بتحليل G_{ot} .

إن الغالبية السائدة من هذا النوع من الـ DNA يتكوّن سواء من متكررات مترادفة التسلسلات متشعبة (متشعبة). هذا ولم يتم وصف أي وظيفة لهذا المكوّن من الجينوم. وكمثال عليه ما يُسمى VNTRs (Variable number tandem repeats).

إن تسلسل DNA المتكرر من VNTRs قد يتكوّن من 15 - 100 زوج قاعدي في الطول، ويتواجد ضمن أو بين الجينات. وتوجد مثل تلك التجمعات منتشرة خلال الجينوم، ويُشار لها في الغالب بالـ Minisatellites.

يتغير عدد النسخ المتكررة لكل تسلسل خاص في كل موقع في الأفراد، مؤدياً إلى تكوين مناطق موقعية من 1000 - 5000 زوج قاعدي (1 - 5 كيلو زوج قاعدي) في الطول. ويُشار إلى التغير في الحجم (الطول) لهذه المناطق بين الأفراد بما يكون بصمة الـ DNA (DNA fingerprinting).

مجموعة أخرى من التسلسلات مترادفة التكرار تتكوّن من نيوكليوتيدات ثنائية، ويُشار لها أيضاً بالـ Microsatellites. وهي تشابه الـ VNTRs في كونها منتشرة خلال الجينوم وتغيرها بين الأفراد في عدد تكراراتها الموجودة في أي موقع. فعلى سبيل المثال، في الإنسان، أكثرها شيوعاً هي الثنائيات النيوكليوتيدية $(CA)_n$ ، إذ n تساوي عدد التكرارات، وأكثر شيء شائع بالنسبة لـ n هو بين 5 و 50. إن هذه التجمعات تستخدم أيضاً في الطب الشرعي، وكذلك يُستفاد منها كعلامات جزيئية (Molecular markers) في تحليل الجينوم.

التسلسلات القفّازة (المتنقلة) المتكررة

Repetitive Transposed sequences: SINES and LINES

وهي مرتبة أخرى من الـ DNA المتكرر والذي يتضمن تسلسلات مُنتشرة خلال الجينوم، وليس متكررة ترادفياً، فهي قد تكون قصيرة أو طويلة، يُطلق عليها التسلسلات القفّازة (Transposable sequences) والتي تكون مُتنقلة ويمكنها الحركة

إلى مواقع مختلفة ضمن الجينوم، مع العلم بأن نسبة كبيرة من جينومات حقيقيات النواة تتكوّن من مثل تلك التسلسلات.

فعلى سبيل المثال العناصر المنتشرة القصيرة (SINES Short interspersed elements) يكون طولها أقل من 500 زوج قاعدي، وقد تمثّل 500000 مرة أو أكثر من جينوم الإنسان. إن أفضل ما تمّ تصنيفه من تسلسلات SINE في الإنسان هو طاقم من التسلسلات ذات العلاقة القوية تسمّى عائلة *Alu family* (الاسم يعتمد على وجود تسلسلات DNA تتميز بوجود موقع الإنزيم القاطع *Alu I*). مجموعة من أفراد هذه العائلة وُجدت كذلك في ثدييات أخرى، بطول 200 - 300 زوج قاعدي، وتكون منتشرة (أكثر من كونها متناسقة خلال الجينوم) بين وضمن الجينات. في الإنسان، هذه العائلة تشمل أكثر من 5% من الجينوم. وأشارت دراسات أخرى إلى أنها تُشكّل 2 - 3% من كل DNA الإنسان.

إن تسلسلات *Alu* ذات أهمية خاصة، على الرغم من أن وظيفتها لم يتمّ تحديدها لحّد الآن، مع العلم أن مجموعات من عائلة *Alu* يتمّ استنساخها أحياناً، إذ إن دور الـ RNA المستنسخ غير مؤكّد، ولكن يُعتقد بأنه ذو علاقة بقابلية الانتقال في الجينوم. وفي الحقيقة يُعتقد بأن تسلسلات *Alu* قد زادت من محتوى الـ RNA والتي انتشر جزئها المكمل من الـ DNA خلال الجينوم نتيجةً لفعالية إنزيم الاستنساخ العكسي (Reverse transcriptase).

وفيما يتعلّق بمجموعة العناصر المنتشرة الطويلة (LINEs Long interspersed elements) فهي تمثّل تسلسلات DNA قفّازة متكررة، وفي الإنسان فإن أكثر مثال شائع هي العائلة التي يُرمز لها L1. مجموعات من عائلة هذا التسلسل بحدود 6400 زوج قاعدي طولاً، وتمثّل ما يصل إلى 100000 مرة طبقاً لأحد التقديرات. كما أن نهايتها 5' تكون كثيرة التغيّر ولا يزال دورها في الجينوم غير معروف.

وحالياً، فإن أساس انتقال عناصر L1 أصبح واضحاً، ففي البداية يتمّ استنساخ تسلسل الـ DNA - L1 إلى جزيئة RNA. ثم يعمل RNA كقالب لتصنيع DNA مكمل

باستخدام إنزيم الاستنساخ العكسي. وهذا الإنزيم يُشفر له من خلال تسلسل L1. أن نسخة L1 الجديدة تتكامل فيما بعد في الـ DNA للكروموسوم في موقع جديد، وبسبب هذا التشابه لميكانيكية هذا الانتقال مع الأسلوب المستخدم من قبل فيروسات Retroviruses، فإنه يُشار إلى LINES باسم Retrotransposons.

هذا وتمثل STNES و LINES جزءاً مهماً من DNA الإنسان، إذ إن كلا النوعين في هذه العناصر تُشارك الحالة التنظيمية في تكوينها بنسبة لخليط بحدود 70٪ مفردة و 30٪ تسلسلات متكررة ضمن الـ DNA، وبمجموعها تُشكل ما يُقارب 10٪ من الجينوم.

الجينات عديدة النسخ ذات التكرار المتوسط

Middle repetitive multiple copy genes

يشتمل الـ DNA متوسط التكرار في بعض الحالات على جينات فعالة تتمثل ترادفياً في نسخ متعددة، فعلى سبيل المثال عدد كبير من النسخ موجودة في الجينات المُشفرة للـ RNA الرايوسومي، فذبابة الفاكهة *Drosophila* تمتلك 120 نسخة لكل نصف جينوم (Haploid genome). وتوجد وحدات جينية مفردة تُشفر إلى جزيئة سابقة (أصل Precursor molecule) كبيرة والتي يتم تحويلها إلى كل من 5.8S، 18S و 28S من الـ rRNA. وفي الإنسان تتجمع نسخ متعددة من هذا الجين على الذراع P للكروموسومات الطرفية (Acrocentric chromosomes) 13، 14، 15، 21، 22. هذا وأن نسخ متعددة من الجينات المُشفرة للـ 5SrRNA يتم استنساخها (بشكل منفصل عن المجموعات المتعددة الموجودة سوية) تقع على الجزء الطرفي للذراع P للكروموسوم رقم 1.

ولا بُد هنا من الإشارة إلى ملاحظة مهمة، وهي أن نسبة كبيرة من DNA جينوم حقيقيات النواة لا تُشفر جينات فعالة. فإذا أخذنا سوية الأشكال المختلفة من تسلسلات الـ DNA ذات التكرار العالي والمتوسط، فهي تُشكل ما يقارب 40٪ من جينوم الإنسان، فبالإضافة إلى الـ DNA المتكرر، هنالك كمية كبيرة من تسلسلات الـ DNA ذات النسخ المفردة (يتم التعرف عليها بتحليل C_{ot}) غير المُشفرة، وجزء بسيط

منها يُسمّى الجينات الكاذبة (Pseudogenes) التي تمثّل بقايا تطورية من نسخ مضاعفة من الجينات، والتي خضعت لطفرات كافية بحيث حولتها إلى جينات غير فعّالة (غير وظيفية)، وفي بعض الحالات نسخ متعدّدة من تلك الجينات تكون موجودة.

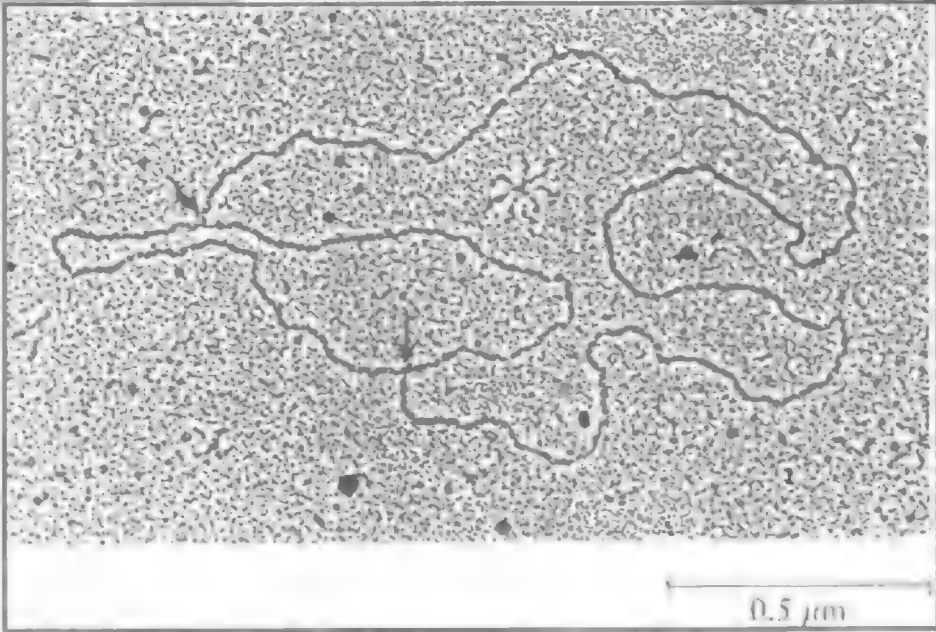
وعلى الرغم من أن نسبة الجينوم المكوّن للـ DNA المتكرر تتغير بين الكائنات الحية، يبدو أنها تشترك في أحد المظاهر، إذ إن جزءاً صغيراً جداً فقط يُشَقَّر إلى بروتينات. فعلى سبيل المثال 20000 - 30000 جين تُشَقَّر إلى بروتينات في قنفذ البحر (Sea urchin) تحتل أقل من 10٪ من الجينوم. وفي الدروسوفيل فقط 5 - 10٪ من الجينوم تتمثّل بجينات مُشَقَّرة لبروتينات. أما في الإنسان، فيبدو بأنها بحدود 30000 جين فعّال تحتل أقل من 5٪ من الجينوم وفق البحوث الحديثة، مع العلم بأن دراسات سابقة أشارت إلى أنها تحتل أقل من 10٪ من الجينوم.

DNA المايتوكوندرية والكلوروبلاست

Mitochondrial and Chloroplast DNA

على الرغم من اهتمامنا في موضوعنا الحالي بـ DNA المايتوكوندرية، ولكننا وجدنا من المناسب التعرّيج على DNA الكلوروبلاست بهدف المقارنة والفائدة العامة.

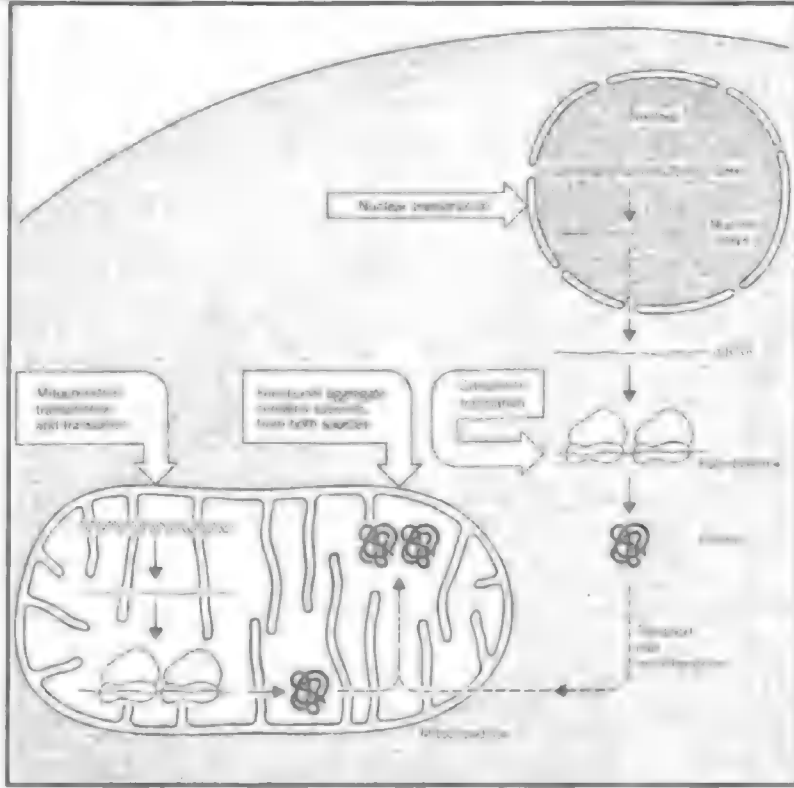
ليس كل الـ DNA الموجود في خلايا حقيقية النواة موجود في النواة، فعلى الرغم من أن الـ DNA النووي يحمل أغلب المعلومات الوراثية للخلية، ولكن كل من المايتوكوندرية والكلوروبلاست تحتويان على بعض الـ DNA الخاص بهما، فضلاً عن الآلية الضرورية للتضاعف والاستنساخ والترجمة للمعلومات المُشَقَّرة من ذلك الـ DNA. يكون DNA هاتين العضيتين مُشابهاً لـ DNA بدائية النواة من ناحية كونه عاري (Naked): غير مُلتف على المستونات كما لوحظ في حقيقيات النواة، كما أنه يكون حلقي (Circular) (شكل 3 - 7).



شكل (3 - 7). DNA المايكوندريا الحلقي في حالة تضاعف

الأسهم تُشير إلى شوكتي التضاعف الواقعتين على طرفي فقاعة التضاعف.

فضلاً عن ذلك فإن التركيب القاعدي لجينوم المايكوندريا والكلوروبلاست في الغالب يختلف بشكل كبير عن الجينوم النووي. وفي كلتا العضيتين يكون الجينوم صغيراً، لذلك فإن العضيتين تستطيعان التشفير لبعض (وليس كل) الببتيدات المتعددة لها، ولذلك فهما عضيات شبه ذاتية (Semiautonomous organelles) وقادرة على تصنيع بعض الببتيدات المتعددة الخاصة بها، ولكن تعتمد على الجينوم النووي لتشفير غلب بروتيناتها (3 - 8).



شكل (3 - 8). التجمعات البروتينية للميتوكوندريا

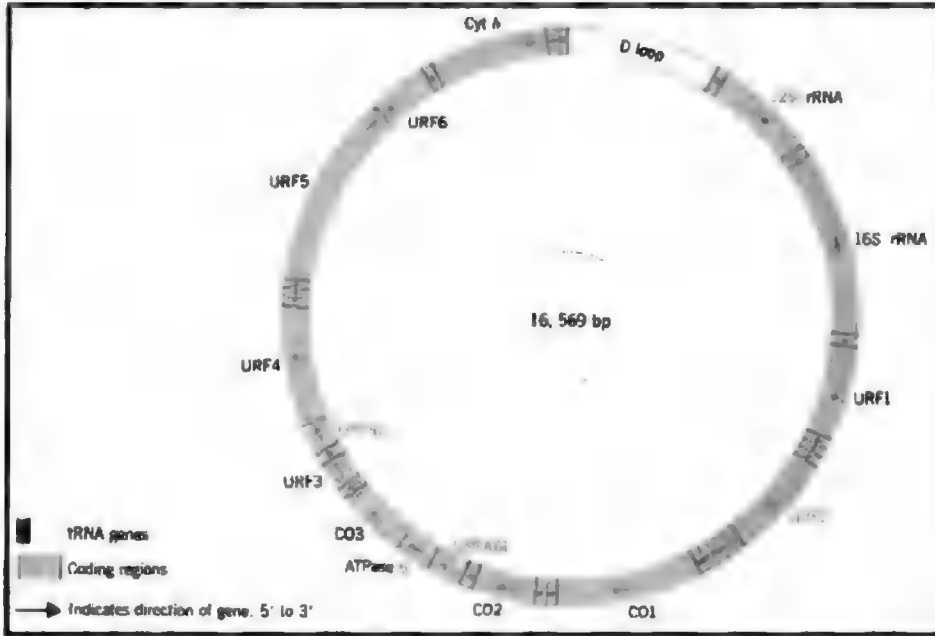
تتركب من نواتج تعبير الجينات النووية وجينات المايكوكوندريا.

إن الجينوم في مايكوكوندريا الإنسان على سبيل المثال، يتكوّن من DNA حلقي يتألف من 15000 زوج قاعدي وبطول محيطي (Contour length) بحدود 5 مايكرومتر. إذ تستطيع هذه الكمية من الـ DNA التشفير فقط لما يُقارب 12 منتج وجزء بسيط (بحدود 5%) من جزيئات RNA وبروتينات تحتاجها المايكوكوندريا، ومع ذلك فإن هذا الـ DNA يلعب دوراً وراثياً حيوياً، لأن تلك المنتجات تشمل جزيئات الـ RNA الموجودة في رايبوسومات المايكوكوندريا وكل جزيئات الـ tRNA اللازمة لتصنيع البروتين في المايكوكوندريا والوحدات الثانوية لبعض بروتينات هذه العضية والتي تشمل Cytochrome b و Cytochrome c oxidase و ATPase.

إن حجم جينوم المايوتوكوندريا يتغير بشكل كبير حسب النوع، فمثلاً مايوتوكوندريا اللبائن نموذجياً تمتلك DNA بحدود 15000 زوج قاعدي. أما الخناثر فإنها تمتلك DNA بحدود 84000 زوج قاعدي، ولكنه بشكل عام يكون بحدود خمس مرات أكبر من DNA اللبائن، وفي النباتات يكون كبيراً ومُتغائراً ويتضمن كل من الجزيئات الحلقية والخطية. ويبدو من خلال المقارنة بين DNA مايوتوكوندريا الإنسان والخميرة بأن الـDNA الإضافي الموجود في مايوتوكوندريا الخميرة يتضمن تسلسلات طويلة غير مُشفرة.

بالنسبة للجينات المُشفرة للبروتينات في جينوم مايوتوكوندريا الخناثر، فإنها يمكن أن تكون مُجزأة (تحتوي على أنترونات)، أو غير مُجزأة (مُكوّنة من أكسونات فقط). في حين لا يحتوي جينوم المايوتوكوندريا في اللبائن على أنترونات. وفي حقيقة الأمر إن بعض الجينات فيه تكون متداخلة (Overlap)، وبشكل عام فإن كل زوج قاعدي في الجينوم لا بُد أن يعود إلى جين معين باستثناء منطقة عروة D (D-loop) المسؤولة عن بدء تضاعف الـDNA، إذ إنه ليس أكثر من 87 زوج قاعدي من مجموع 16569 زوج قاعدي في DNA مايوتوكوندريا الإنسان يقع بين المناطق المُشفرة. يتشكل جينوم المايوتوكوندريا في اللبائن من 22 جين مسؤول عن tRNA وجينين مسؤولين عن rRNA و 13 منطقة تشفير بروتيني، إذ تم تحديد البروتين المُشفّر منه لبعض منه، والبعض الآخر لا يزال غير معروف (مؤشر بالحروف URF) (شكل 3 - 9).

ونجد من الطريف هنا الإشارة إلى دراسة Goodman و Brown (1979) التي تضمنت 21 إنسان يعودون إلى عروق مختلفة (Different races) إذ وجدوا بأن 14 فرد يمتلكون 64 موقع قطع متماثل في الـDNA المايوتوكونديري في حين أن 7 أفراد قد أظهروا واحداً أو أكثر من الاختلافات.



شكل (3 - 9). ترتيب الجينات في جينوم مايتوكوندريا الإنسان

تحتوي الكلوروبلاست على DNA حلقي بحدود 130000 زوج قاعدي، فضلاً عن الـ rRNA و tRNA، فإن جينوم هذه العضية يُشفر إلى العديد من الببتيدات المتعددة تتضمن واحدة من وحدتين ثانويتين موجودة في Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase، وهو الإنزيم المُثبت للكربون في دورة Calvin.

إن كل من الببتيدات المتعددة المُشفر إليها بواسطة جينوم المايتوكوندريا والكلوروبلاست هي جزء ثابت من بروتين متعدد الحدود (Multimeric)، إذ يحتوي أيضاً على وحدات ثانوية يُشفر إليها بواسطة الجينوم النووي، فكل بروتين في العضية يتكوّن من وحدات ثانوية تكون هجينة (Hybrid)، ويتألف من بعض الببتيدات المتعددة تُشفر وتُصنع في العضية، وأخرى يُشفر إليها من خلال الجينوم النووي، وتُصنع بواسطة رايبوسومات السايوبلازم (شكل 3 - 8).

الفصل الرابع

تداول الأحماض النووية

الفصل الرابع

تداول الأحماض النووية

في هذا الفصل سوف نستعرض بعض الطرق الأساسية في كيفية تداول وتحليل جزيئات الأحماض النووية، وعلى الرغم من أن موضوعنا ينصب بالدرجة الأساسية على استخلاص الـ DNA من الإنسان، ولكن ذلك لا يُضير من التنويه على كائنات أخرى ولو كانت نباتية.

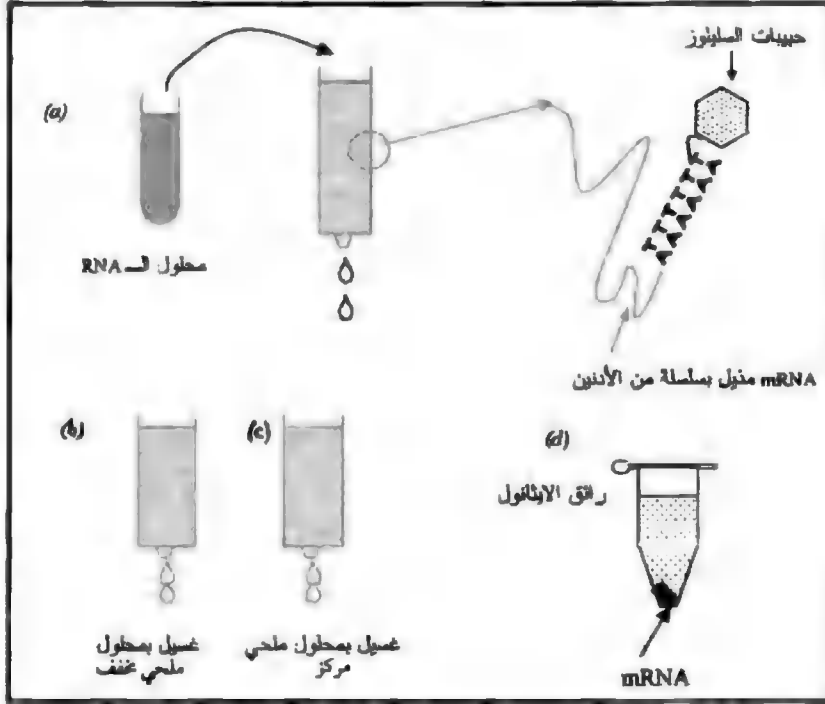
استخلاص الـ DNA والـ RNA:

لا بُدّ وفي أية تجربة يستخدم فيها الجين من الحاجة إلى مصدر يُستخلص منه الحامض النووي سواء كان DNA أو RNA، وتتضمن الخطوة الأولى في عملية الاستخلاص تفتيت المادة الأولية سواء كانت فايروسية أو بكتيرية أو فطرية أو نباتية أو حيوانية، ولتجنّب تضرّر الأحماض النووية المراد استخلاصها، يُفضّل استخدام الإنزيمات المُحلّلة للجدار الخلوي (فيما يتعلّق بالخلايا الحاوية على الجدار مثل الخلايا النباتية)، مع استعمال المنظّفات الكيماوية المُحلّلة للأغشية الخلوية. هذا ويُراعى عند الضرورة استخدام طريقة أكثر قساوة في سبيل تمزيق الخلايا (كما هو الحال لبعض الأجزاء النباتية)، إذ إنه قد يتعرّض الـ DNA للتقطيع، الأمر الذي قد يُعيق إنتاج الجزيئات التركيبية النموذجية.

بعد عملية تمزيق الخلايا يتم التخلّص من البروتينات بالفينول أو خليط الفينول/كلوروفورم مع الطرد المركزي، لتتجمّع الجزيئات البروتينية في طبقة الفينول الوسطى، وتتجمّع الأحماض النووية في الطبقة العليا للمحلول والتي يتم ترسيبها فيها بعد باستخدام الأيزوبروبانول (Isopropanol) أو الإيثانول المُبرّد خلال الطرد المركزي.

في حالة استخلاص الـ DNA يُستخدم الإنزيم RNase (Ribonuclease) للتخلّص من الـ RNA، أما في حالة استخلاص الـ mRNA بهدف تصنيع الـ DNA المُكَمَّل (cDNA) فيتم استخدام أعمدة السليلوز المربوط مع سلاسل الثايمين القصيرة

Oligo(dT)-cellulose التي ترتبط مع الذيل متعدد الأدينين (Poly-A) الموجود في خيوط mRNA، إذ يُعطي هذا الأسلوب كمية كبيرة من mRNA ويُزيل أغلب المخلفات العالقة به (شكل 4 - 1).



شكل (4 - 1). فصل mRNA باستخدام كروماتوغرافيا الألفة خلال عمود يحتوي على حبيبات السليلوز المربوطة مع سلاسل الثايمين القصيرة (Oligo(dT)-cellulose)

- (a) يمر الـ RNA الكلي (Total RNA) الموجود في المحلول خلال العمود، إذ تلتحم سلسلة الثايمين بالذيل متعدد الأدينين (Poly-A) للـ mRNA.
- (b) تُغسل بقايا الـ RNA (الأنواع الأخرى من الـ RNA والمخلفات) بوساطة محلول منظم منخفض الملوحة.
- (c) يُستخلص الـ mRNA باستخدام محلول منظم عالي الملوحة لفك الارتباط بين A و T.

(d) يُرسب الـ mRNA بالإيثانول المُبرّد خلال عملية الطرد المركزي.

هذا ويستخدم الطرد المركزي فائق السرعة (Ultracentrifugation) لتحضير الـ DNA البلازميدي باستخدام محلول كلوريد السيزيوم (CsCl) Cesium chloride متدرج الكثافة، وبعد فترة تصل إلى 48 ساعة يتكثف الـ DNA البلازميدي ويكوّن طبقة في مكان مُحدّد في أنبوبة الاختبار، إذ تؤخذ هذه الطبقة ويتم التخلص من بقايا كلوريد السيزيوم من أجل الحصول على DNA نقي.

تداول وتقدير كمية الأحماض النووية:

في تجارب الكلونة تستخدم كميات ضئيلة من الأحماض النووية تقدر بالميكروغرام والنانوغرام والبيكوغرام، وذلك بعمل تخفيفات في الماء أو في محاليل مُنظمة، ويحدّد التركيز بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي A_{260} نانوميتر باستخدام جهاز المقياس الضوئي الطيفي (Spectrophotometer)، إذ يعادل المقياس 1 عند هذا الطول الموجي التركيز 50 مايكروغرام / ملي للحامض النووي DNA مزدوج الشريط، أو تركيز 40 مايكروغرام / ملي للحامض النووي DNA مفرد الخيط أو الـ RNA. ولمعرفة درجة النقاوة في المحاليل المُحضرة من الـ DNA (خلوها النسبي من الفينول أو البروتين) يتم تقسيم مقدار القراءة عند الطول الموجي A_{260} على القراءة عند A_{280} والتي يجب أن تكون أكبر أو تساوي 1.8 للـ DNA النقي، و 2 للـ RNA النقي. والمعادلات التالية توضّح ذلك:

$$O.D_{260nm} \times \text{Dilution factor} \times 50\mu\text{g/ml} = \mu\text{g/ml} \text{ DNA}$$

$$O.D_{260nm} \times \text{Dilution factor} \times 40\mu\text{g/ml} = \mu\text{g/ml} \text{ RNA}$$

$$\frac{O.D_{260nm}}{O.D_{280nm}} = \text{or} > 1.8 \text{ معادلة تقدير نقاوة الـ DNA}$$

$$\frac{O.D_{260nm}}{O.D_{280nm}} = \text{or} > 2 \text{ معادلة تقدير نقاوة الـ RNA}$$

كما يمكن تقدير تركيز الـ DNA من خلال شدّة صبغة بروميد الإيثيديوم (Ethidium bromide) التي تندغم بين قواعد الـ DNA وتعكس ضوءاً بارتفاعاً عند مرور الأشعة فوق البنفسجية (UV)، وبقياس وميض العينة ومعايرتها مع العينة

القياسية، يمكن اكتشاف كمية ضئيلة من الـ DNA قد تصل إلى نانوغرام واحد والتي يصعب قياسها باستعمال جهاز المقياس الضوئي الطيفي نتيجةً لوجود الشوائب.

يتم ترسيب الـ DNA بالآيزوبروبانول أو الإيثانول، ويفضل الأخير الذي يُضاف إلى المحلول بنسبة 2 : 1 ويوجد 0.2 مولار من الملح عند درجة صفر مئوي، إذ يُجمع الـ DNA بالطرد المركزي في قاع الأنبوبة، ومن ثم يُنشف ويُعاد تعليقه مرةً أخرى في محلول مُنظم ويوزع إلى كميات صغيرة تُحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.

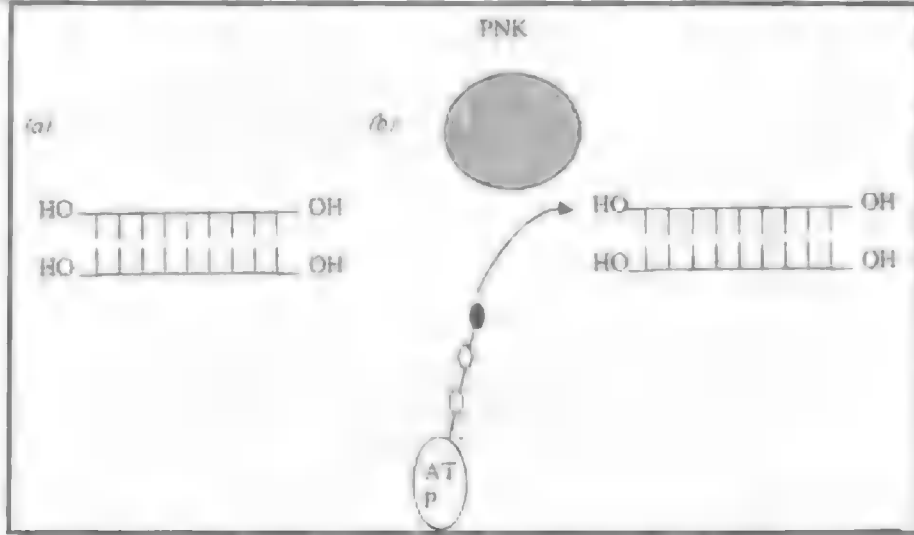
التوسيم الإشعاعي للأحماض وصناعة المجسات:

نظراً لصعوبة تتبع الكميات الضئيلة من الأحماض النووية أثناء خطوات العمل، فإن الحامض النووي يوسم إشعاعياً باستعمال الـ dNTP (Deoxynucleoside triphosphats) المُعلّمة الحاوية على عناصر مُشعة مثل الهيدروجين (^3H) أو الفسفور (^{32}P) والتي يُستدل عليها بالمقياس الومضي (Scintillation counter).

إن الإجراء الآخر هو التهجين الجزيئي (Hybridization) الذي تستعمل فيه المجسات المُشعة (المُعلّمة). والاختلاف بين هذه الطريقة والطريقة أعلاه يعتمد بشكل كبير على النشاط الإشعاعي النوعي (Specific activity)، ففي الطريقة الأولى تستعمل عناصر منخفضة الإشعاع، أما في حالة المجسات فتستعمل عناصر عالية الإشعاع مثل الفسفور المُشع (^{32}P)، وسيرد وصف الطرائق الشائعة للتوسيم (التعليم) في الفقرات اللاحقة.

التوسيم الطري End labeling:

يتم معاملة قطع الـ DNA المراد توسيمها بالإنزيم Alkaline-phosphatase لتزاع مجموعة الفوسفات الموجودة عند النهاية 5' وترك مجموعة الهيدروكسيل (OH) حرة، ثم يستعمل الإنزيم Polynucleotide kinase لاستبدال مجموعة الهيدروكسيل بمجموعة فوسفات مُعلّمة إشعاعياً وإعطاء حامض نووي له خاصية إشعاعية طرفية منخفضة (شكل 4 - 2).



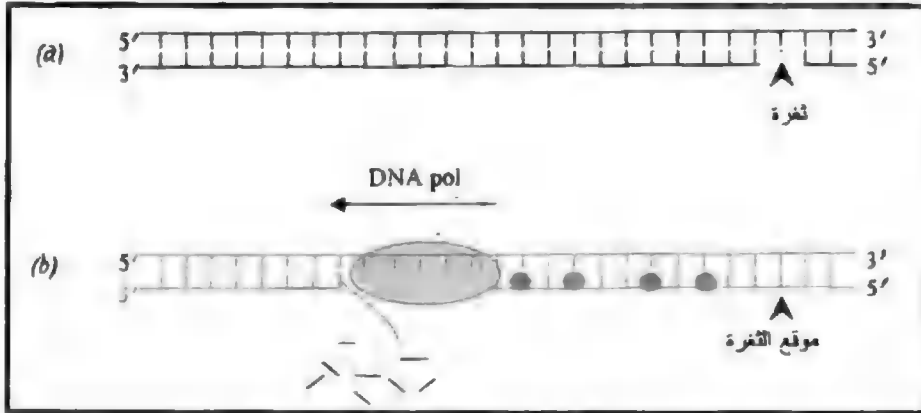
شكل (4 - 2). توصيم طرف الـ DNA باستعمال إنزيم
الـ (PNK) Polynucleotide kinase

- (a) نزع مجموعة الفوسفات من الـ DNA بإضافة إنزيم الـ Phosphatase لتكوّن مجموعة الهيدروكسيل (5'-OH).
- (b) تنقل ذرة الفوسفات الطرفية المشعة ATP ($\alpha\text{-}^{32}\text{P}$) المشار إليها بالدائرة السوداء إلى النهاية 5' بواسطة إنزيم PNK (يمكن أن يحدث ذلك بواسطة تفاعل تبادلي مع النهايات الطرفية 5'-phosphate).

ترجمة الشفرة Nick translation

تعتمد هذه الطريقة على قدرة إنزيم البلمرة I الـ DNA polymerase I على ملء الشغرات المتكوّنة على محور الفوسفات ثنائية الأستر (Phosphodiester) للـ DNA، وقد تتكوّن هذه الشغرات إما طبيعياً أو بإضافة تراكيز منخفضة من الإنزيم I الـ DNase في محلول التفاعل مكوناً نهايات حرة هيدروكسيلية (3'-OH) وفسفورية (5'-phosphoryl)، وعند إضافة إنزيم البلمرة فإنه يُحفّز عملية إحلال النيوكليوتيدات المفقودة وبناء الأطراف الحرة، وذلك بإدخال مجموعات من dNTPs

فإذا كانت واحدة منها مُعلّمة سيكون الـ DNA الناتج موسوماً بالعنصر المُشع بحيث يمكن الاستدلال عليه (شكل 4 - 3).



شكل (4 - 3). توسيم الـ DNA بطريقة ترجمة الثغرة

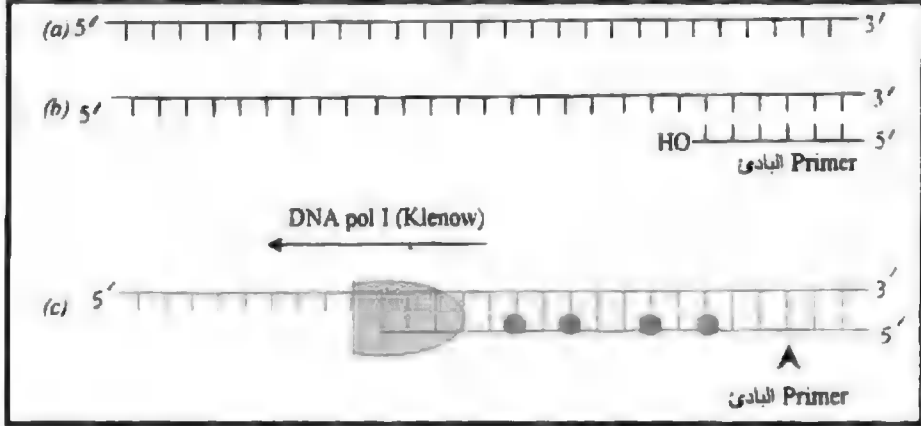
(a) يتم تكوين شريط مفرد وذلك بتكوين ثغرة في محور روابط الفسفور ثنائية الأستر باستعمال الإنزيم DNase I.

(b) يصنع إنزيم الـ DNA polymerase (DNA pol) شريط مفرد مقابل للشريط القالب (الأعلى) ويعمل في الوقت نفسه على تحليل الشريط غير القالب (الأسفل) في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ وفي حالة توفر العنصر المُشع $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})$ في الـ dNTP المضافة في محلول التفاعل لتكوين شريط جديد مُشع بفعل الـ dNTP الداخلة في تركيبه (الدوائر السوداء).

التوسيم بإطالة البادئ Labeling by primer extension

تعتمد هذه الطريقة على استعمال سلاسل نيوكليوتيدات قصيرة (Oligonucleotides) كبادئ لبناء شريط الـ DNA بمساعدة إنزيم الـ DNA polymerase. ولكي يتم توسيم الـ DNA فلا بُدَّ من فتحه بالحرارة، إذ تلتحم الهوائى النيوكليوتيدية مع الأشرطة الأحادية للـ DNA، ومن ثم تعمل قطعة كلينو Klenow fragment (وهي جزء من إنزيم بلمرة الـ DNA لها القدرة على إضافة نيوكليوتيدات لسلسلة الـ DNA النامية) بتكوين نسخة من القالب ابتداءً من مجموعة OH - $3'$ في

سلسلة النيوكليوتيدات القصيرة، فإذا ما تم إدخال مجموعة مُشعة من dNTP فسيتج عن ذلك DNA له خاصية إشعاعية عالية (شكل 4-4).



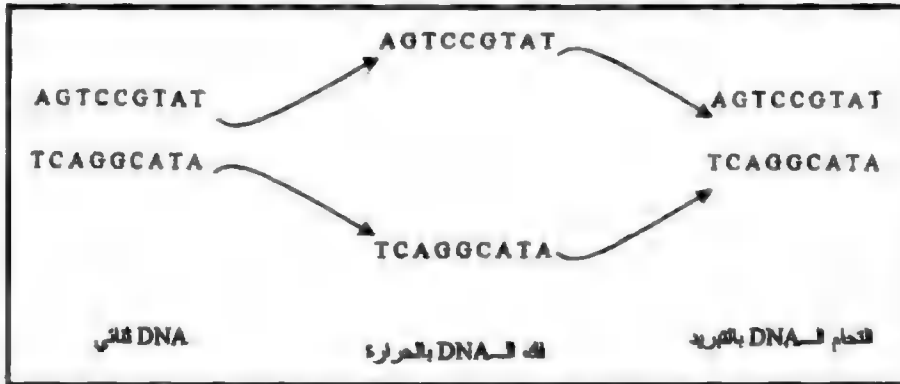
شكل (4-4). توسيم DNA بإطالة البادئ

- (a) يفتح DNA ليعطي جزيئات من الأشرطة المفردة.
 (b) تضاف النيوكليوتيدات القصيرة كبادئ لتكوّن منطقة قصيرة من الشريط المزدوج لها مجموعة OH- 3' حرة.
 (c) تقوم قطعة كينو بتصنيع نسخة من الشريط القالب ابتداءً من طرف OH- 3' للبادئ بإضافة dNTP (α - 32 P) المُشار إليها بالدوائر السوداء لتُعطي جزيئات DNA عالية الإشعاع.

التهجين الجزيئي للـ DNA:

إن الطبيعة التكاملية لقواعد DNA هي إحدى المظاهر المهمة التي يمكن استغلالها في الهندسة الوراثية، فإذا تم تسخين حلزون DNA فإن الجديلتين تنفصلان عن بعضهما البعض، ومن الممكن إعادتهما إلى حالتها الطبيعية بالتبريد (شكل 4-5). يمكن الاستفادة من هذه الخاصية للحصول على المعلومات المتعلقة بتعقيد تركيبة تسلسل DNA، كما هو الحال في معرفة طبيعة DNA لحقيقيات النواة على النحو الآتي:

- * بعض الـ DNA يكون عروات مزدوجة لاحتوائها على تسلسلات تسمى بالمتكررات العكسية (Inverted repeats) أو البالدرومية (Palindromes) والتي تنثني على بعضها مكونة تراكيب تشبه مشبك أو دبوس الشعر، وهذا ما يُسمى بالـ DNA المعقوف (Foldback DNA).
- * تسلسلات عالية التكرار (Highly repetitive) وهي الثانية في سرعة إعادة الالتحام وتوجد لمرات عديدة في الجينوم.
- * تسلسلات معتدلة التكرار (Moderately repetitive).
- * التسلسلات المتميزة أو ذات النسخة المفردة التي نادراً ما تلتحم مرة أخرى مع الشريط المكمل لها تحت ظروف هذا الاختبار.



شكل (4 - 5). أساس تهجين الـ DNA

هنالك طريقة أخرى حساسة جداً لالتقاط تسلسل مُعين من خليط الـ DNA، وهي استعمال تسلسل نقي وموسوم بالعنصر المشع ^{32}P كمجس، إذ يفتح (يُمسخ) هذا المجس ليتكامل تسلسله مع تسلسل الـ DNA المُستهدف.

يتم تفريد (فصل) الـ DNA المراد تهجينه، ثم يُثَبَّت على غشاء النيتروسليلوز أو النايلون، وتُجرى عملية التهجين عند درجة حرارة 65 - 68°م لعدة ساعات للسماح لعملية التكامل، ثم تُغسل الزيادة من المجس، ومن ثم تُقاس درجة التهجين بقياس درجة الإشعاع أو بتحضير الصورة الإشعاعية، إذ تُعَرَّض العينة لفلم حساس لأشعة أكس، وسيتم مناقشة ذلك في الموضوعات اللاحقة.

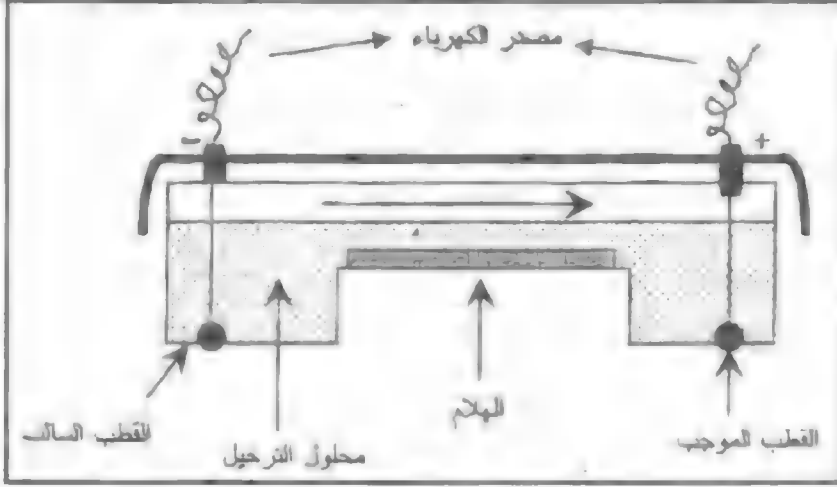
الترحيل الكهربائي الهلامي:

يُعدّ الترحيل الكهربائي من الإجراءات المهمة في مجال الهندسة الوراثية، إذ يمثل الطريقة المثلى لملاحظة أجزاء الـ DNA مباشرة، وتستند فكرة ذلك على أن الأحماض النووية عبارة عن مُركّب أيوني سالب الشحنة في الوسط المتعادل نتيجة لوجود مجاميع الفوسفات على محور الفوسفات ثنائي الأستر، وهذا يعني أنه عندما توضع جزيئات الأحماض النووية في مجال كهربائي فإنها سوف تُهاجر من القطب السالب ناحية القطب الموجب.

يُستعمل لهذا الإجراء طبقة من الهلام تعمل على فصل جزيئات الأحماض النووية بناءً على أحجامها بمساعدة جهاز الترحيل الكهربائي، إذ يستعمل نوعين من الهلام، وهما هلام الأجاروز (Agarose) وهلام متعدد الأكريل أمايد (Polyacrylamide). إذ يُستخلص الأجاروز من الأعشاب البحرية ويُباع على هيئة مسحوق تتم إذابته في المحاليل المتعادلة بتركيز مُلائمة تتراوح بين 0.3 - 2% (وزن/حجم) ويتصلّب بالتبريد ليكوّن الهلام، ويستعمل لذلك أوعية خاصة (شكل 4 - 6). أما هلام الأكريل أمايد فإنه يستعمل لفصل الجزيئات الصغيرة للـ DNA في بعض الاستعمالات مثل قراءة تسلسل الـ DNA أو فصل الحُرُم البروتينية، لأن ثقوبه أصغر من ثقوب هلام الأجاروز. ويوضح الجدول (4 - 1) معدّل الفصل لجزيئات الأحماض النووية في كل من هلامي الأجاروز والأكريل أمايد.

جدول (4 - 1). مواصفات الفصل هلامي الأجاروز والأكريل أمايد

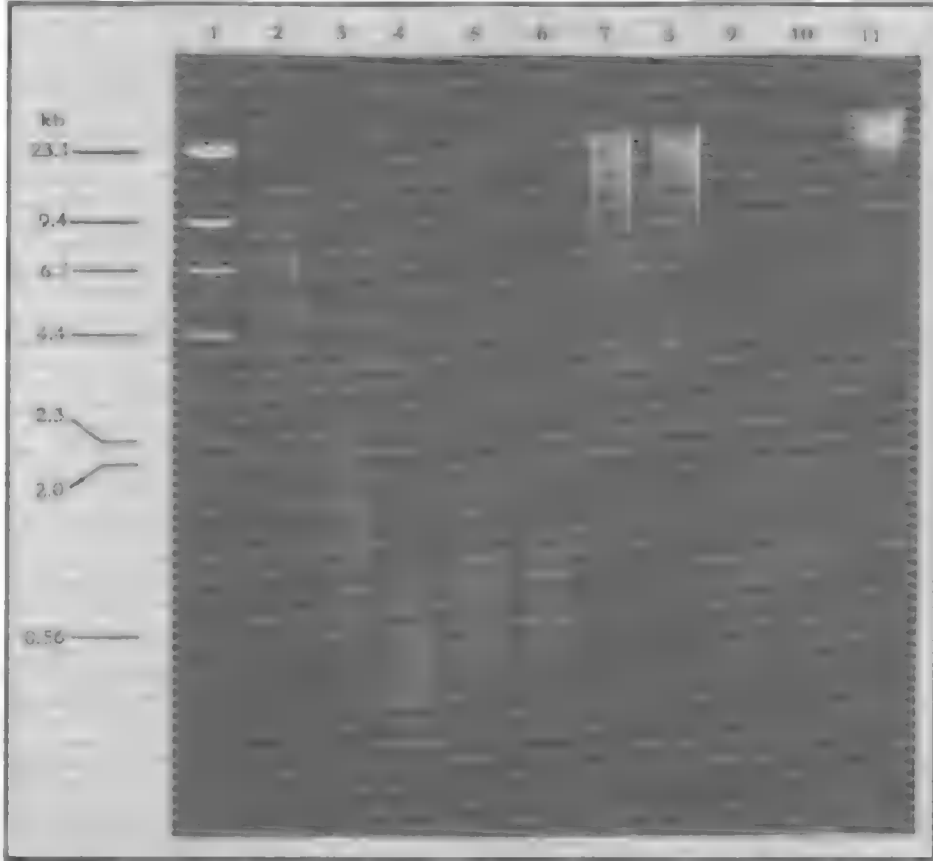
نوع الهلام وتركيزه	مدى الفصل (زوج قاعدي)
0.3% أجاروز	1000 - 50000
0.7% أجاروز	300 - 20000
1.4% أجاروز	300 - 6000
4% أكريل أمايد	100 - 1000
10% أكريل أمايد	25 - 500
20% أكريل أمايد	1 - 50



شكل (4 - 6). الجهاز النموذجي المستعمل في الترحيل الكهربائي

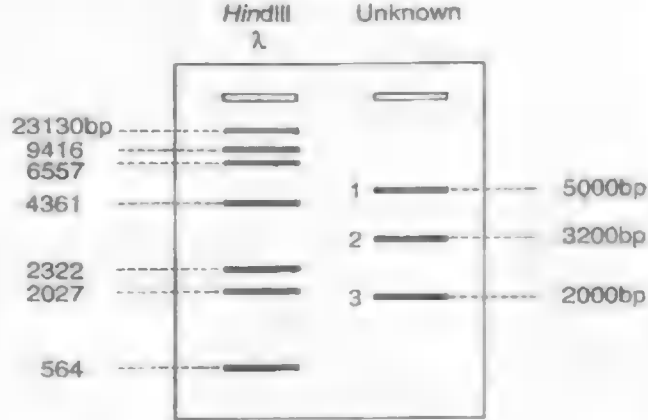
يُغطى الهلام بالمحلول المنظم (Buffer)، ولهذا يُستى في بعض الأحيان بهلام الأجاروز الغاطس (Submerged agarose gel electrophoresis) SAGE. توضع عينات الأحماض النووية في حُفر الهلام، ومن ثم تُرحل باتجاه القطب الموجب كما هو مُشار إليه بالسهم الأفقي.

يتم الترحيل الكهربائي بوضع عينات الحامض النووي في حُفر عند إحدى نهايتي الهلام ثم يُمرر تيار كهربائي إلى أن تصل صبغة التحميل الدالة (صبغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol blue المضافة إلى العينة قبل ترحيلها) بالقرب من النهاية الأخرى. هذا ويمكن تحديد الأحماض النووية بإضافة بروميد الإيثيديوم (Ethidium bromide) ثم تُفحص بتعريضها للأشعة فوق البنفسجية، إذ تظهر على هيئة حُزم برتقالية اللون يمكن تصويرها ودراستها (شكل 4 - 7). ويمكن تقدير أحجام القطع المجهولة برسم مُنحنى مُعايرة (Calibration curve) للعينة القياسية (المُكوّنة من قطع DNA معلومة الحجم الجزئي مثل الفاج لامدا المُقطّع بأحد الإنزيمات القاطعة)، علماً بأن ارتحال القطع يتناسب عكسياً مع لوغاريتم العدد 10 لعدد الأزواج القاعدية، (شكل 4 - 8)، إذ يُفيد هذا الإجراء فيما يُعرف بخريطة التقطيع الإنزيمي (Restriction mapping). كما أنه يستعمل بصورة تقليدية في تحليل ودراسة البروتينات.

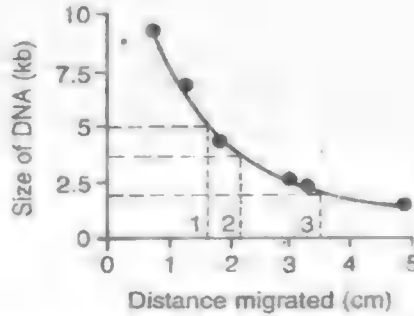


شكل (4 - 7). صورة هلام الأجاروز مصبوغ بزيادة بروميد الإيثيديوم ومعرض للأشعة فوق البنفسجية، إذ تظهر عينات الـ DNA على هيئة حُزم برتقالية الحُزم الموجودة في المجال 1 تمثل DNA الفاج لامدا (كدليل حجمي) مقطوع بالإنزيم *Hin dIII* مع الإشارة إلى أحجام القطع بالكيلو زوج قاعدي (Kb). أما المجالات الباقية فهي تحتوي على عينات DNA قطعت بإنزيمات مختلفة، ونظراً للطبيعة المختلفة للعينات، فقد تباين نمط الهجرة لها، وظهرت على هيئة مسحات طويلة (Smears) على الهلام، فالعينات التي قطعت مسافة أطول في المجالات 3، 4، 5، 6، 9، 10 تتكوّن من قطع DNA أصغر في الحجم الجزئي مقارنةً بالعينات التي بقيت قريبة من الحُفر التي وُضعت فيها العينات في المجالات 2، 7، 8، 11.

(a) Rough estimation by eye



(b) Accurate graphical estimation



شكل (4 - 8). تقدير الحجم الجزيئي لقطع DNA بعد ترجيلها على هلام الأجاروز

(a) تقدير تخميني بالاعتماد على النظر.

(b) تقدير دقيق بالاعتماد على منحنى قياسي تم رسمه على ضوء الأحجام الجزيئية

لقطع الفاج لامدا (بعد تقطيعه بالإنزيم *Hin dIII*) والمسافة التي قطعتها تلك القطع في الهلام.

دراسة تسلسل الـ DNA (DNA sequencing):

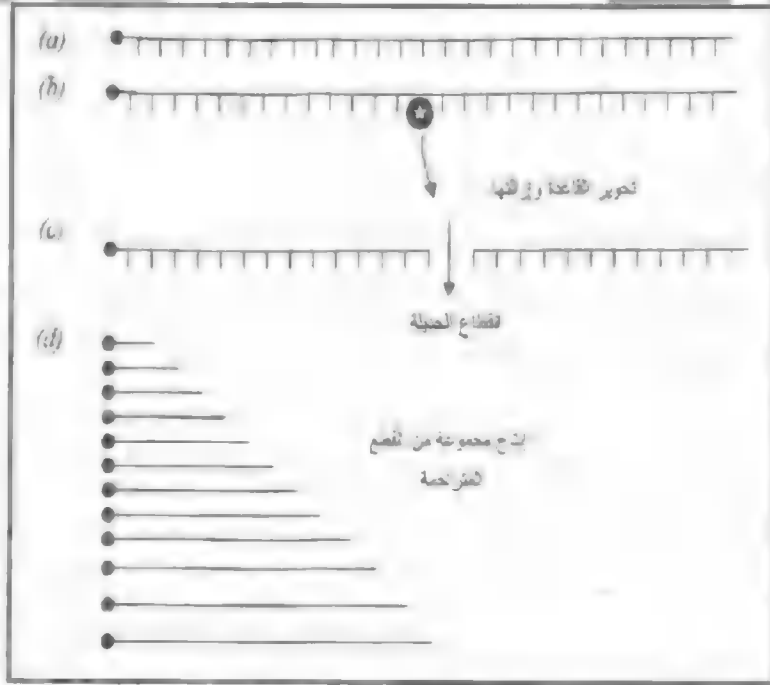
إن القدرة على تحديد تسلسل القواعد في الـ DNA هي الأساس المهم في علم الأحياء الجزيئي لما توفره من معلومات متقدمة عن تركيب الـ DNA التي أدت إلى تسارع التجارب وتطويرها مع نهاية السبعينات، إذ توجد لذلك طريقتان رئيسيتان:

الأولى، صمّمها كل من Walter Gilbert و Allan Maxam، إذ يستعمل فيها مواد كيميائية تُقَطِّع الـ DNA، وتكوّن قطع تختلف عن بعضها بفارق نيوكليوتيدة واحدة.

أما **الثانية**، فقد صمّمها Fred Sanger و Alan Coulson، وهي تتضمن استعمال إنزيم يستنسخ أشرطة الـ DNA. ورغم تشابه الطريقتين من ناحية تحليل القطع والترحيل الكهربائي والتصوير الإشعاعي، لكن الطريقة الإنزيمية هي الأكثر شيوعاً.

طريقة Maxam - Gilbert الكيميائية:

تعتمد هذه الطريقة على تكسير خيط الـ DNA بشكل مدروس، إذ تتم هذه العملية باستعمال مواد كيميائية تعمل بشكل خاص على القواعد النيتروجينية، إذ إن كل مجموعة من تلك المواد تؤدي إلى تكسير الـ DNA عند نوع مُعيّن من القواعد، بحيث ينتج عن ذلك خليط من الخيوط المختلفة بأطوالها بمقدار نيوكليوتيدة واحدة فقط. إن عملية القطع تتم على مرحلتين، ففي الأولى تُضاف مادة كيميائية تعمل على تحوير نوع مُعيّن من القواعد النيتروجينية، وفي الثانية تُضاف مادة كيميائية تؤدي إلى قطع خيط الـ DNA في ذلك الموقع المُحوّر، فمثلاً تعمل مادة الـ Dimethyl sulfate على تحوير القاعدة G من خلال إضافة مجموعة مثيل إلى الموقع N7 هذه القاعدة، وعند ذلك سيكون من الممكن كسر خيط الـ DNA عند هذه القاعدة المُحوّرة بفعل مادة ثانية (تعمل على قطع الشريط) وهي الـ Piperidine وهكذا لبقية أنواع القواعد النيتروجينية الأخرى، ولكن باستعمال مواد مُحوّرة وقاطعة أخرى (شكل 4 - 9).



شكل (4 - 9). دراسة تسلسل الـ DNA بطريقة Maxam - Gilbert

- (a) إنتاج شريط مفرد مُعلّم بالعنصر المشع.
- (b) تحويل وإزالة قواعد الـ DNA كيميائياً بمعدل قاعدة واحدة في الجزيء الواحد.
- (c) كسر محور الفسفور ثنائي الأستر باستعمال الـ Piperidine.
- (d) إنتاج مجموعة من قطع الـ DNA مختلفة الطول (بواقع نيوكليوتيدة واحدة) مُعلّمة في الطرف 5'.

إذ تتم الطريقة وفق السياق الآتي:

1. تعليم قطعة الـ DNA تحت الدراسة بإضافة مجموعة فوسفات مؤشرة بـ ^{32}P إلى الطرف 5' لكل من خيطي حلزون الـ DNA.
2. فصل خيطي الـ DNA عن بعضهما بإضافة مادة (Dimethyl sulphoxide) DMSO والتسخين إلى درجة حرارة 90°م، إذ يؤدي ذلك إلى كسر الأواصر الهيدروجينية.
3. تُرخل الأشرطة المفردة الناتجة على هلام متعدد الأكريل أميد لفصل خيطي الـ DNA ومن ثم الحصول على أحدهما بصورة نقية. وبما أن الخيطين يختلفان عن بعضهما من حيث

محتواهما من القواعد البيورينية (A و G) والبايريميدينية (C و T)، فإن أحد الخيطين سيكون ثقيلًا لاحتوائه على نسبة أكبر من القواعد البيورينية مقارنةً بالخيط المقابل (الأخف)، وعليه سيتحرك الخيط الأثقل إلى مسافة أقل منها بالنسبة للخيط الأخف.

4. تُستخلص حُرمة الخيط الثقيل من الهلام وتُقسم إلى أربعة أجزاء.

5. يُستعمل كل جزء لتحديد مواقع نوع مُعين من القواعد، فمثلاً يستعمل الجزء الأول لتحديد موقع كل G من خلال إضافة مادة كيميائية مُحَوَّرة ومادة أخرى تُقَطَّع الخيط عند ذلك الموقع المُحَوَّر (إن ظروف التفاعل يجب أن تُضبط بحيث لا يزيد عدد الكسور في الخيط عن كسر أو كسرين فقط)، إذ ينتج عن ذلك مجموعة من الخيوط مختلفة في الأطوال وتنتهي كلها بالقاعدة G عند الطرف 3'. تُكرر العملية مع الأجزاء الثلاثة الباقية باستعمال مواد مُحَوَّرة وقاطعة خاصة بكل قاعدة، إذ تتكوّن مجموعة من خيوط الـ DNA مختلفة في الأطوال وتشارك بنفس النيوكليوتيدة عند الطرف 5' (المُعلَّم شعاعياً) ولكنها تختلف عند الطرف 3'.

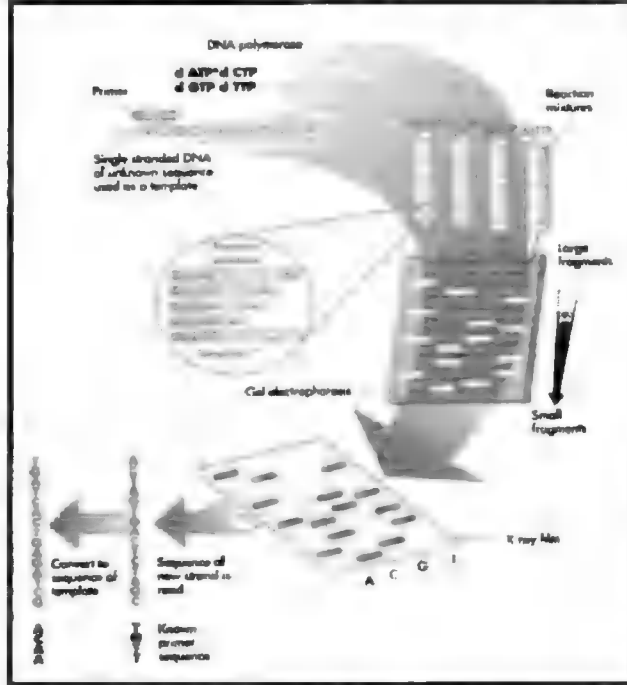
6. تُفصل الخيوط المفردة لكل تفاعل على هلام متعدد الأكريل أميد، ويتم تحديد مواقع الحُرْم المُشَعَّة بواسطة التصوير الإشعاعي الذاتي.

طريقة Sanger – Coulson الإنزيمية:

تُسمّى هذه الطريقة أيضاً بطريقة إيقاف السلسلة (Chain termination method) أو يُطلق عليها Dideoxy ويُشترط فيها كون قطعة الـ DNA المرغوب معرفة تسلسلها على شكل خيط مفرد لكي تستعمل بمثابة قالب لتصنيع الخيط الثاني بواسطة إنزيم بلمرة الـ DNA، لذلك يتم كلونة الـ DNA تحت الدراسة في أحد النواقل المُشتقة من الفاج M13.

يقوم إنزيم بلمرة الـ DNA بتخليق خيط جديد مُكَمَّل للخيط المُكَلون، وفضلاً عن قابلية الإنزيم على إضافة النيوكليوتيدات الاعتيادية فإنه من الممكن أن يُضيف مشابهاً النيوكليوتيدات (2, 3, dideoxynucleoside triphosphates) التي تفتقر إلى مجموعة الهيدروكسيل في الموقع 3' للسكر الخماسي، لذلك فإن إضافة تلك المشابهاً سوف يؤدي إلى إيقاف نمو سلسلة الـ DNA الجديدة بسبب تعذّر إضافة النيوكليوتيدات إلى طرفها الخالي من مجموعة OH- 3'.

بعد ارتباط البادئ بالمنطقة المجاورة للـ DNA المكلون تبدأ عملية تصنيع الخيط الجديد بوساطة قطعة كلينو (Klenow fragment) لإنزيم البلمرة DNA polymerase I (قطعة كلينو هي الجزء المسؤول عن تصنيع خيوط الـ DNA في جزيئة الإنزيم، أما الجزء الآخر من الإنزيم فيكون مسؤولاً عن تحطيم الـ DNA) (شكل 4 - 10).

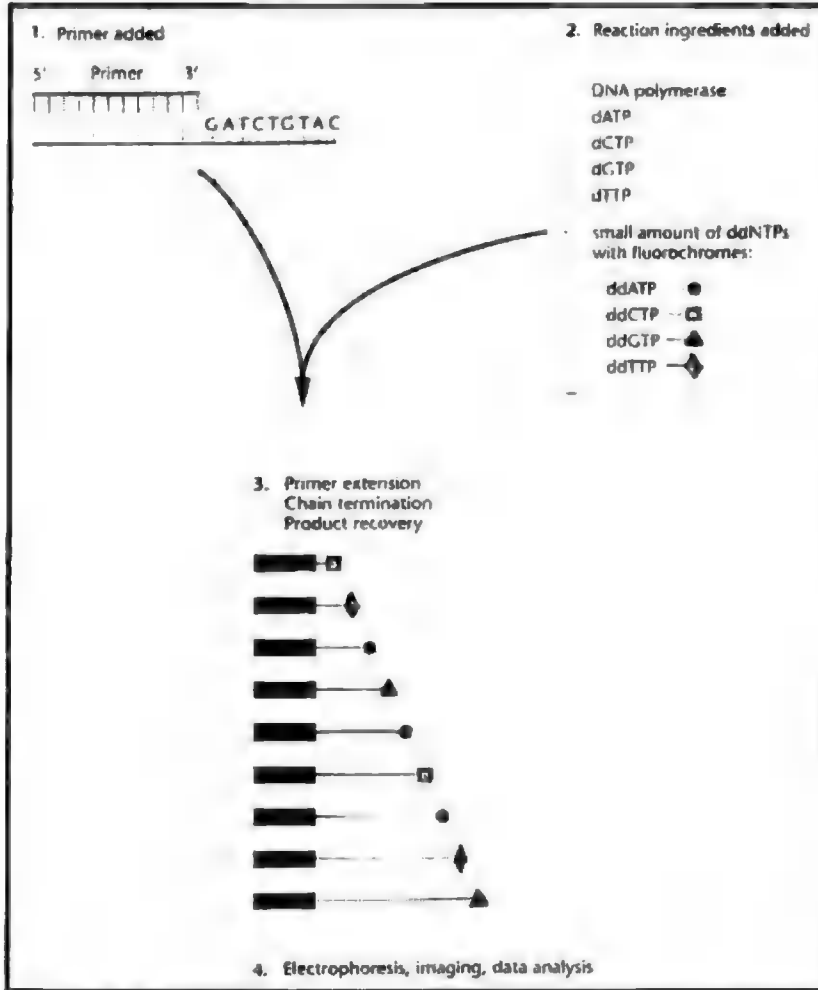


شكل (4 - 10). دراسة تسلسل الـ DNA باستخدام طريقة Dideoxy يُضاف البادئ المُعلّم إلى DNA مفرد الشريط غير معروف التسلسل. يعمل إنزيم DNA polymerase على إضافة القواعد الحرة إلى الشريط المفرد بالاعتماد على أساس التزاوج القاعدي المكتمل. تتم أربعة تفاعلات مختلفة، كل واحد يُضاف إليه Dideoxynucleotide (ddATP، ddCTP، ddGTP، ddTTP)، وهذه تعمل على إنهاء تسلسل الـ DNA حينما يتم إدغامها بدل القاعدة الاعتيادية deoxynucleotide (dATP، dCTP، dGTP، dTTP)، والتي تناظر القواعد (A، C، G، T على التوالي). ينتج عن ذلك قطع متغايرة بالطول يمكن فصلها بالترحيل الكهربائي. إن موقع كل قطعة يتم تحديده بوساطة انبعاث جسيمات مُشعة من إحدى القواعد المُعلّمة.

ويمكن تلخيص خطوات هذه الطريقة بالآتي:

1. كلؤؤة قطعة الـ DNA المرؤوب ءراسة تسلسلها في الفاج M13 وإضافة باءئ مكمّل للطرف 3' لتلك القطعة.
2. إضافة الأنواع الأربعة من النؤوكليؤيؤاء: dATP ، dTTP ، dGTP ، dCTP ، ولا بُء من كون واحدة أو أكثر منها مُعلّمة إشعاعياً مثل استعمال النؤوكليؤيؤة المُشّعة $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ التي تعطي نؤيجة أءق من استعمال الفسفور المُشع ^{32}P .
3. تقسيم الخليط إلى أربعة أنابيب بحيث يُضاف لكل أنبؤة إءءى مُشابهات (مُناظرات) النؤوكليؤيؤاء. فمثلاً يُضاف للأنبؤة الأولى ddATP والثانية ddCTP والثالثة ddGTP والرابعة ddTTP. إن إضافة هذه المُشابهات يعمل على إيقاف بناء السلسلة، فإذا كانت الأنبؤة الأولى محتؤة على ddATP فإن إنزيم البلمرة سيضيف dATP أو ddATP مقابل كل T في القالب، إذ يؤءي ذلك إلى استمرار التصنيع في الحالة الأولى، وإيقافه في الحالة الثانية، وينتج عن هذا تكوين خليط من خيوط DNA ءءيدة مُشّعة وذات أطوال مُختلفة تنتهي بـ ddATP عند الطرف 3'، وهكذا في الأنابيب الثلاث الباقية. وبهذا سيتتج خليط من خيوط الـ DNA المُختلفة الأطوال والتي تحتؤي جميعها على نفس النؤوكليؤيؤة في الطرف 5' ولكنها تُختلف في الطرف 3'.
4. تُفصل الخيوط الناءجة لكل تفاعل من التفاعلات الأربعة بوساطة ترحيلها كهربائياً في هلام متعدد الأكريل أمامء المُحضّر بتركيز يسمح بفصل حُزم الـ DNA المُصنّعة حتى لو كانت مُختلفة بمقدار نؤوكليؤيؤة واحدة.
5. يتم تحءيد مواقع الحُزم في الهلام بطريقة التصوير الإشعاعي الءائي Autoradiography. هذا ويتم جمع المعلومات وءراسها عن طريق الكؤمبيؤتر الءي يُنجز بعض التحليلات كترجمة تسلسلات الأحماض الأمينية والتعرّف على مواقع القطع والمناطق المُشابهة في التسلسلات، وكذلك التراكيب المهمة الأءرى كالحفاظات ومناطق السيطرة (Control regions).

وفي دراسة تسلسل الجينوم، أو بالأحرى عند دراسة تسلسلات DNA كثيرة، يتم استعمال جهاز أوتوماتيكي يعمل على تحديد تسلسل بضع مئات الآلاف في اليوم الواحد، وفي هذه الطريقة المحوّرة عن الطريقة الأصلية أعلاه، تُعلّم الـ Dideoxynucleotides المناظرة بواسطة صبغات وميضية (Fluorescent dyes) (شكل 4 - 11)، لذلك فإن إنهاء السلسلة بالـ A يُعلّم بلون مُعين. والسلسلة المنتهية بـ C تُعلّم بلون آخر، وهكذا للقواعد الأربعة. إن التفاعل هنا يتم في أنبوبة واحدة ويُحتمل أيضاً في حفرة واحدة في الهلام، وتعمل وحدة قراءة الوميض في جهاز تحليل التسلسل على قراءة الألوان لكل حزمة وتحديد كونها تمثل A أو T أو C أو G. تُخزن المعلومات وتُحلّل باستعمال برنامج مناسب أو تُطبع لغرض القراءة.



شكل (4 - 11). دراسة تسلسل الـ DNA باستعمال dideoxynucleotides مُعلّمة بصبغات ومبضية

كل ddNTPs الأربع تُضاف في الأنبوبة نفسها، وخلال استطرالة البادئ فإنه سيتم إنتاج كل التشكيلات. تُضاف نواتج للتفاعل في حفرة واحدة في الهلام. وتقرأ الحزوم بواسطة وحدة القراءة ونظام الصورة. تُعرف هذه العملية بالأوتوماتيكية والميكانيكية الروبوتية (الآلية)، وقد استعملت في مشروع جينوم الإنسان (Human Genome Project).

● = صبغة حمراء، ■ = صبغة زرقاء، ▲ = صبغة خضراء، ◆ = صبغة صفراء.

الفصل الخامس

إنزيمات التداول مع الـDNA

الفصل الخامس

إنزيمات التداول مع الـ DNA

يحتاج العامل في مجال الهندسة الوراثية إلى وسائل لقطع وتوصيل وتحوير جزيئات الأحماض النووية وتعريفها، إذ يتمثل ذلك باستعمال الإنزيمات التي سهلت كثيراً من التعامل مع تلك الأحماض، وهي عبارة عن مواد مستخلصة من الكائنات الدقيقة المختلفة وتزود الآن من الشركات المصنعة بشكلٍ جاهز.

إنزيمات قطع الـ DNA:

تمثل إنزيمات قطع الـ DNA إحدى أهم الوسائل التي مكّنت من سهولة التعامل مع الـ DNA، وهي توجد في خلايا البكتيريا كجزء من آلية وقائية تُسمى نظام القطع والتحوير (Restriction-modification system)، إذ تعمل على تحليل أي DNA غريب يدخل الخلية، من ناحية أخرى تقوم بتحوير DNA الخلية نفسها عن طريق الميثلة (Methylation) وهي إضافة مجموعة ميثيل (CH_3) لبعض القواعد في مناطق عمل الإنزيم لمنع من قطع الـ DNA الموجود أصلاً في الخلية. توجد ثلاثة أنواع من الإنزيمات القاطعة (I و II و III)، ويتميز النوع الثاني (Type II) بأنه الأكثر استعمالاً، إذ تقطع إنزيمات هذا النوع الـ DNA من الداخل، ولذلك يُطلق عليها الإنزيمات القاطعة الداخلية (Endonuclease) أو إنزيمات القطع (Restriction enzymes)، وتُعدّ المقص الجزيئي للعاملين في هذا المجال.

والجدول (5 - 1) يُبين أهم الفروقات بين الأنواع الثلاثة:

جدول (5 - 1). خصائص الإنزيمات القاطعة الداخلية بأنواعها الثلاثة

الخاصية	Type I	Type II	Type III
الفعاليات القاطعة والتحويرية	إنزيم مفرد ذو وظائف متعددة	إنزيمات قاطعة وإنزيمات مثيلة منفصلة	إنزيمات منفصلة ذات وحدات ثانوية في الغالب
التركيب البروتيني للإنزيم القاطع	3 وحدات ثانوية مختلفة	بسيط	وحدتين ثانويتين مختلفتين
المتطلبات للقطع	ATP، Mg^{2+} S-adenosyle-methionine	Mg^{2+}	ATP، Mg^{2+} ، وتحتاج جزئياً للمادة S-adenosyle-methionine
تسلسل المواقع المتخصصة	<i>Eco</i> B: TGAN ₆ TGCT <i>Eco</i> K: AACN ₆ GTGC	تناظر تدويري Rotational symmetry	<i>Eco</i> P1: AGACC <i>Eco</i> P15: CAGCAG
مواقع القطع	من المحتمل عشوائية، على الأقل 1000 bp من الموقع المتخصص	عند أو بالقرب من الموقع المتخصص	24 - 26 bp إلى النهاية 3' للموقع المتخصص
التحول الإنزيمي Enzymatic turnover	كلا	نعم	نعم
انتقال الـ DNA (DNA translocation)	نعم	كلا	كلا
موقع المثيلة	موقع متخصص	موقع متخصص	موقع متخصص

N = أي نيوكليوتيدة.

الإنزيمات القاطعة من النوع الثاني:

تم تسمية هذه الإنزيمات باستعمال ثلاثة حروف اعتماداً على جنس ونوع الكائن المجهرى الذي تُستخلص منه، إذ يتكوّن اسم الإنزيم من الحرف الأول (يُكتب كبيراً) لاسم الجنس، والحرفين الأولين من اسم النوع (يُكتبان صغيران)، وبما أن هذه الحروف مُشتقة من الاسم العلمي للكائن، ولذلك إما أن يوضع تحتها خط أو تُكتب مائلة. فمثلاً يُكتب الإنزيم المُستخلص من بكتريا *Escherichia coli* على النحو Eco، والإنزيم المُستخلص من بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* على النحو Bam. وقد يُضاف رمز يدل على تسلسل الإنزيم أو سلاسة البكتريا أو صفات أخرى (جدول 5 - 2).

جدول (5 - 2). يوضح بعض الإنزيمات القاطعة والمواقع المُشخصة ونتائج القطع

المصدر البكتري	الإنزيم	التسلسل المشخص (موقع القطع)	
<i>Anabaena variabilis</i>	Ava I	C↓(C)CG(Δ)G	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	Bam HI	G↓GATCC	
<i>Bacillus globigii</i>	Bgl II	A↓GATCT	
<i>Escherichia coli</i> RY13	Eco RI	G↓AA ⁺ TTC	1,4
<i>Escherichia coli</i> RY245	Eco RII	↓CC(Δ)GG	2
<i>Haemophilus aegyptius</i>	Hae III	GG↓C ⁺ C	
<i>Haemophilus gallinarum</i>	Hga I	GACGC (5/10)	3
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	Hha I	GC ⁺ G↓C	
<i>Haemophilus influenza</i> Rd	Hind II Hind III	GT(Δ)↓(C)A ⁺ C A ⁺ ↓AGCTT	
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I Hpa II	GTT↓AAC C↓C ⁺ GG	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kpn I	GGTAC↓C	
<i>Moraxella bovis</i>	Mbo I	↓GATC	
<i>Providencia stuartii</i>	Pst I	CTGCA↓G	
<i>Serratia marcescens</i>	Sma I	CCC↓GGG	
<i>Streptomyces stanford</i>	Sst I	GAGCT↓C	
<i>Xanthomonas malvacearum</i>	Xma I	C↓CCGGG	

إن التسلسلات في الجدول أعلاه والمتعرف عليها من قبل إنزيمات القطع كُتبت من 3' → 5' على شريط واحد، كما أن مكان القطع قد تمّ تأشيرته بسهم. القواعد التي كُتبت بين قوسين تمثل إمكانية وجود أي من القاعدتين في موقع أو تسلسل القطع. إن القواعد المحوّرة بإنزيمات الميثلة المناظرة تمّ تأشيرها بنجمة. فمثلاً A^* هي N^6 -methyladenine، C^* هي 5-methylcytosine. إذ يوجد نوعان من تلك الإنزيمات المحوّرة وهما dam methylase و dem methylase. يُضيف الأول مجموعة مثيل إلى الموقع N^6 لقاعدة الأدينين في التسلسل 5 - GATC - A والذي يتمثل في الموضع الحساس لبعض الإنزيمات القاطعة. ويُضيف الثاني مجموعة مثيل إلى الموقع C^5 للسايتوسين في التسلسل 5 - CCAGG - 3 أو 5 - CCTGG - 3 الذي يتمثل في بعض المواضع الحساسة لبعض الإنزيمات أيضاً.

أما بالنسبة للأرقام 1 و 2 فإن أسماء هذين الإنزيمين شاذان، إذ إن الجينات المسؤولة عن هذين الإنزيمين ناشئة عن عوامل انتقال للمقاومة (Resistance Transfer Factors) والتي صُنّفت بشكل مستقل بالرموز RI و RII.

وفيما يتعلق بالإنزيم *HgaI* فإن موقع قطعه يكون كالآتي:

5'GACGCNNNNN↓

3'CTGCGNNNNN↑

إذ إن N هي أي نيوكليوتيدة، ولذلك وضع بجانبه (5/10) في الجدول أعلاه. وبالنسبة للرقم 4 في الجدول، فإنه في بعض الظروف (قلّة القوة الأيونية، الـ pH القاعدي أو 50% جليسيرول) يُلاحظ قلّة تخصصية الإنزيم *EcoRI* وعليه تُصبح فقط الأربع نيوكليوتيدات الداخلية من التسلسل السداسي كافية للتشخيص والقطع، وهذا ما يُسمّى بفعالية النجمة $EcoRI^*$ (أو RI-star). ويتم تنشيطها بوساطة مادة Parachloromercuribenzoate، إذ تكون فعالية *EcoRI* غير حساسة لذلك. كما أن عدداً كبيراً من الإنزيمات القاطعة الأخرى تُظهر فعالية النجمة، أي قلّة التخصص تحت ظروف غير مثالية.

تتميز هذه الإنزيمات بتخصصها العالي، إذ إن كل إنزيم يُشخص تسلسل مُعين من نيوكليوتيدات الـ DNA مُكوّن إما من 4 أو 5 أو 6 أزواج أو أكثر من تلك النيوكليوتيدات، وعند معاملة جزيئة DNA كبيرة بعدد من الإنزيمات القاطعة كل واحد على حدة، يُلاحظ أن عدد مرات القطع يختلف من إنزيم لآخر بسبب اختلاف تردد (Frequency) الموقع الحساس (موقع القطع) للإنزيمات المختلفة في تلك الجزيئة. إن تردد المواقع الحساسة للإنزيمات التي تتعرّف على تسلسلات رباعية هي أكثر من تردد المواقع الحساسة للإنزيمات التي تتعرّف على تسلسلات سداسية. وبشكل عام يمكن تقدير تردد المواقع الحساسة للإنزيمات القاطعة في جزيئة الـ DNA باستعمال المعادلة التالية على فرض توزيع هذه المواقع عشوائياً على تلك الجزيئة.

تردد الموقع الحساس = $(4)^n$ ، والرقم 4 يمثل القواعد الأربعة (C, G, A, T) المكوّنة لجزيئات الـ DNA.

حيث إن n = عدد النيوكليوتيدات المكوّنة للموقع الحساس. وعليه يمكن توقع تردد أي تسلسل رباعي بمرّة واحدة في كل $(4)^4 = 256$ bp. في حين إذا كان التسلسل سداسياً يكون تردده مرة واحدة لكل $(4)^6 = 2096$ bp. بناءً على ذلك فإن الإنزيم الذي يُميز تسلسلاً رباعياً سوف يُنتج مقاطعاً من الـ DNA أقصر منها بالنسبة للإنزيم السداسي. وهنا لا بُدّ من التنويه إلى أن المعادلة أعلاه تمثّل حساباً نظرياً لتردد مواقع القطع، وليس بالضرورة أن ينطبق ذلك على الواقع العملي.

استعمال الإنزيمات القاطعة من النوع الثاني:

تُضاف إنزيمات القطع بكميات محددة في محلول التفاعل، ثم يُحضن عند درجة حرارة 37°م. ويُعبّر عن النشاط الإنزيمي بالوحدات (Units) فالوحدة الواحدة من الإنزيم هي كمية الإنزيم اللازمة لقطع ميكروغراماً واحداً من الـ DNA خلال ساعة واحدة عند درجة حرارة 37°م. ورغم أن أغلب التجارب قد تتطلب هضم الـ DNA بشكل تام، إلا أن هناك بعض الحالات قد يستعمل فيها تراكيز مختلفة من الإنزيم وأزمنة متفاوتة لإحداث هضم جزئي، اعتماداً على الهدف من التجربة.

تعتمد قطعة الـ DNA التي ينتجها الإنزيم على موقع القطع، وكما لاحظنا سابقاً أن طول القطعة يعتمد على تكرار حدوث موقع القطع في تسلسل الـ DNA، ويحدد طرف القطع للإنزيم نوع نهايات الجزء المقطوع، وهو مهم في الاستعمالات اللاحقة للـ DNA، ويترتب على ذلك ثلاثة أنواع مُحتملة لأنواع الأجزاء المُنتجة وهي:

أ. قطع ذات نهايات مستوية (Blunt) لا توجد بها قواعد فردية حرة في نهاياتها.

ب. قطع لها نهايات 3' بارزة. ج. قطع لها نهايات 5' بارزة (شكل 5 - 1).

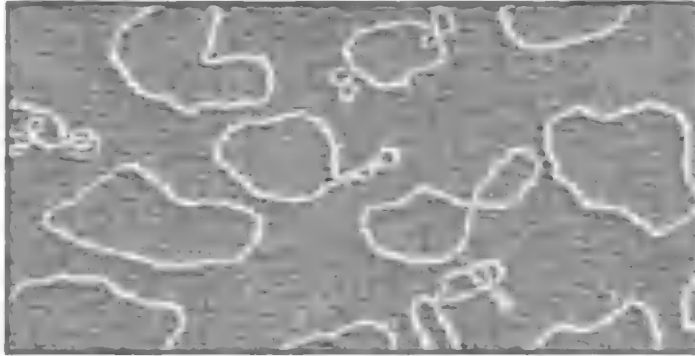
(a)	<i>HaeIII</i>	<i>PstI</i>	<i>EcoRI</i>
(b)	5'-GGCC-3'	5'-CTGCAG-3'	5'-GAATTC-3'
(c)	GG↓CC CC↑GG	CTGCA↓G G↑ACGTC	G↓AATT CTTAA↑G
(d)			
	نهاية مستوية	بارزة 3'	بارزة 5'

شكل (5 - 1). أنواع النهايات الناشئة عن تأثير إنزيمات مختلفة مع تسلسل القطع

وأماكن القطع موضحة في (b) و (c) على التوالي. (d) نماذج ممثلة للنهايات الناشئة

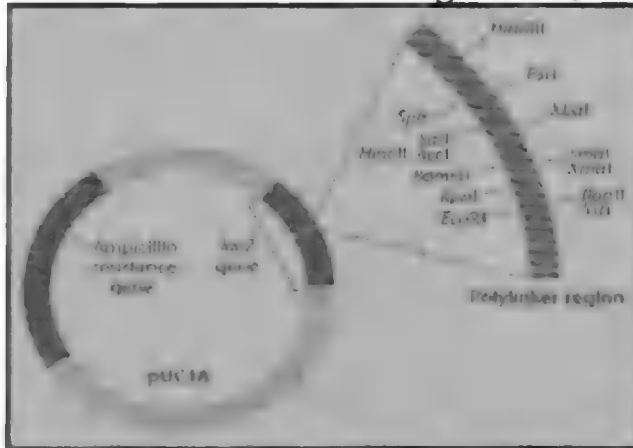
يُنتج كل من إنزيم *PstI* والإنزيم *EcoRI* قطع بارزة (Cohesive) أو لزجة، لها قواعد فردية طرفية يمكن أن تتزاوج مع قواعد متواليات اتحادية ناتجة عن الإنزيم نفسه، ولهذا عند قطع عيتين مختلفتين من الـ DNA بالإنزيم نفسه، يمكن إنتاج DNA تركيبى (مشكل) (rDNA). ومن هذا يتبين أن استعمال هذه الإنزيمات يمثل الجانب الأساسي لكثير من تطبيقات الهندسة الوراثية.

لقد تمّ هندسة أعداد كبيرة لمواقع قطع إنزيمية متفرّدة في نواقل كلونة مختلفة كالبلازميدات مثلاً (شكل 5 - 2).



شكل (5 - 2). صورة دقيقة بالمجهر الإلكتروني لجزيئات بلازميدية دائرية معزولة من بكتريا الـ *E. coli*

إذ يتم وضع مواقع القطع الإنزيمية المتفردة هذه على شكل تجمع في منطقة واحدة (تجمع عنقودي Clusters in one region) يُطلق عليه بالموقع متعدد مواقع القطع (Polylinker site) (شكل 5 - 3).



شكل (5 - 3). البلازميد pUC18

والذي يمتلك ميزات عديدة كناقلة كلونة، إذ يستطيع استقبال قطع DNA كبيرة نسبياً في تجارب الكلونة، كما أنه يتضاعف بعدد كبير من النسخ، ويملك عدد كبير من مواقع القطع في موقع الـ Polylinker تقع ضمن جين *lacZ*. إذ تعتمد عملية الانتقاء لهذا البلازميد في حالة احتوائه على قطع DNA مكلونة على أساس أن البكتريا الحاوية على بلازميد pUC18 عادي (لا يحمل قطع مكلونة) تنتج مستعمرات زرقاء اللون عند تمهيتها على وسط يحتوي على مادة X-gal. وعند إدغام قطعة DNA في موقع الـ Polylinker سيؤدي إلى تعطيل جين *lacZ* وتعطيل فعاليته، مؤدياً بذلك إلى ظهور مستعمرات بيضاء اللون، وبذلك يمكن وبسهولة التعرف المباشر على المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على بلازميدات تتضمن قطع DNA مكلونة.

تحديد الخريطة بواسطة الإنزيمات القاطعة (Restriction mapping):

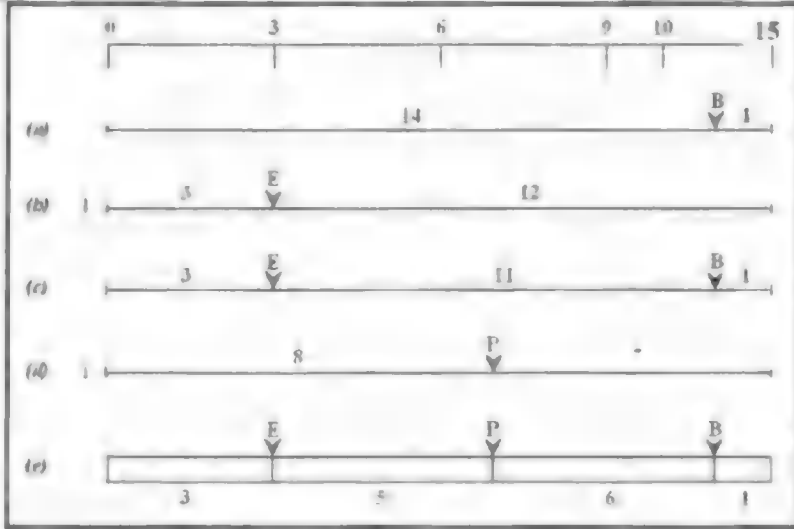
يوجد لقطع الـ DNA مواقع مختلفة لتأثير الإنزيمات، وغالباً ما يكون من المفيد معرفة الموقع النسبي لهذه القطع الذي يُحدّد عن طرق التخريط الإنزيمي (Restriction mapping) وهو قطع أجزاء الـ DNA بإنزيم واحد أو بمجموعة إنزيمات في آن واحد، وبعد ذلك تفحص القطع الناتجة بإجراء الترحيل الكهربائي على هلام الأجاروز وتحدّد أحجامها وتُدرس من خلال المعلومات المتحصّل عليها كما في المثال الآتي:

لنفترض أننا نريد أن نحدّد أماكن قطع الإنزيمات *EcoRI* و *PstI* و *BamHI* في قطعة DNA طولها 15 كيلو قاعدة (kb). إذ تُجرى لذلك عدّة خطوات من التقطيع الإنزيمي، ثم تُحلّل الأجزاء الناتجة وتُحدّد أحجامها كما هو مبين في الجدول (5 - 3). ومن هذا يتّضح أن الهضم بكل إنزيم على حدة ينتج عنه قطعتان من الـ DNA له مكان قطع واحد لكل إنزيم، وهكذا عند استعمال إنزيمين يمكن رسم الخريطة الإنزيمية الكاملة كما في الشكل (5 - 4).

جدول (5 - 3). تقطيع قطعة DNA حجمها 15 كيلو قاعدة بثلاثة إنزيمات قاطعة

<div style="display: flex; justify-content: space-between; padding: 5px;"> <i>BamHI</i> + <i>EcoRI</i> </div>						
<div style="display: flex; justify-content: space-between; padding: 5px;"> <i>BamHI</i> + <i>EcoRI</i> </div>						
<div style="display: flex; justify-content: space-between; padding: 5px;"> <i>BamHI</i> + <i>EcoRI</i> </div>						
<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>PstI</i>	<i>EcoRI</i>	<i>PstI</i>	<i>PstI</i>	<i>PstI</i>
14	12	8	11	8	7	6
1	3	7	3	6	5	5
			1	1	3	3
						1

ملاحظة: الأرقام المبينة هي الأطوال بالكيلو قاعدة (kb) للقطع الناتج عن تقطيع قطعة DNA طولها 15 كيلو قاعدة بإنزيمات *BamHI* ، *EcoRI* ، *PstI* إذ تمّ القطع بإنزيم واحد ثمّ باثنين ثمّ بالثلاثة معاً.



شكل (5 - 4). التخریط الإنزيمي

(a) عندما تهضم قطعة حجمها kb 15 بإنزيم *Bam*HI ينتج قطعتين: 14 و kb 1.

(b) القطع الناتجة باستعمال *Eco*RI: 12 و kb 3.

(c) الهضم بالإنزيمين *Bam*HI / *Eco*RI ينتج عنه القطع 11 و kb 1 و 3.

(d) تكون القطعتين 8 و kb 7 عند استعمال إنزيم *ps*tI.

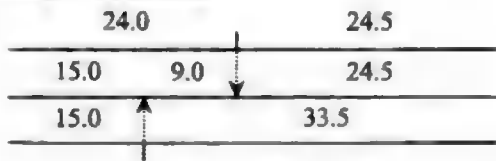
ومن ثم يمكن الحصول على الخريطة النهائية كما في (e).

مثال آخر:

لنفترض أننا قمنا بإجراء القطع الإنزيمي لـ DNA الناقل λ الخطي، وكانت

النتائج كالآتي:

الإنزيم	عدد القطع	الحجوم (kb)			
<i>Xba</i> I	2	24.0	24.5		
<i>Xho</i> I	2	15.0	33.5		
<i>Kpn</i> I	3	1.5	17.0	30.0	
<i>Xba</i> I + <i>Xho</i> I	3	9.0	15.0	24.5	
<i>Xba</i> + <i>Kpn</i> I	4	1.5	6.0	17.0	24.0



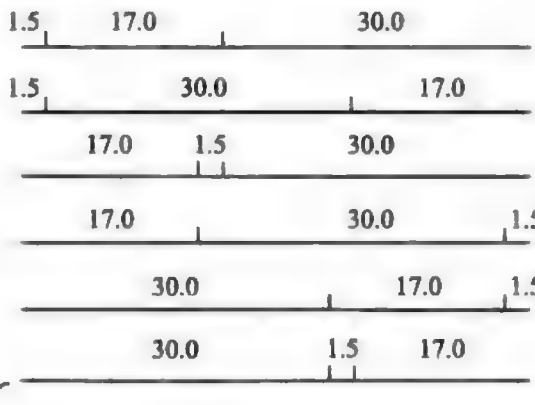
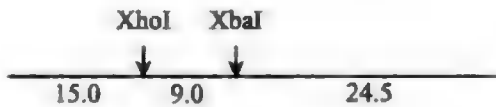
XbaI

XbaI + XhoI

XhoI

∴ الخريطة المحتملة للتقطيع بـ XhoI

+ XbaI هي:



بالنسبة لاحتمالات الخريطة

للإنزيم KpnI هي 6

احتمالات:

ولو أضفنا نتائج القطع

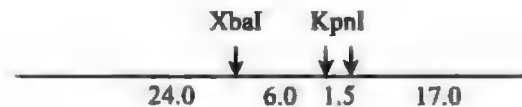
بالإنزيم XbaI والتي هي:

نجد أنها عند الاحتمال رقم 6

تعطي أربع قطع فعلاً بحيث

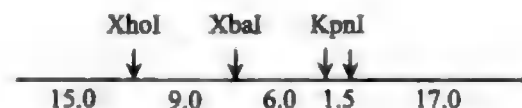
تكون الخريطة للإنزيمين

XbaI + KpnI هي:



عند رسم الخريطة للإنزيمات

الثلاثة تصبح:



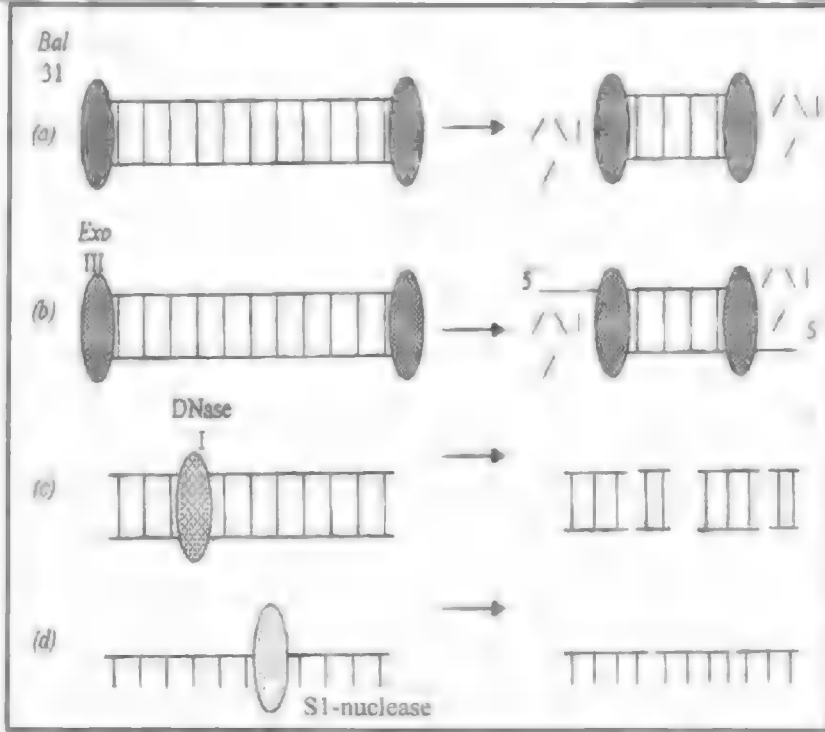
الإنزيمات المحوّرة:

تقوم إنزيمات القطع التي وصفت في السابق والإنزيم اللاصق (DNA ligase) بوظيفة القطع واللتصق المهمتين لإنتاج جزيئات الـ DNA التركيبية، كما أن هناك إنزيمات أخرى تُستعمل في الهندسة الوراثية تُسمى الإنزيمات المحوّرة للـ DNA وفيما يلي وصفها.

إنزيمات الـ Nucleases:

تقوم هذه الإنزيمات بتقطيع الأحماض النووية من خلال كسر الأصرة الفوسفاتية ثنائية الأستر التي تربط النيوكليوتيدات مع بعضها، مثل إنزيمات القطع الداخلية (Endonucleases) التي تقوم بالقطع خلال حلزون الـ DNA، وإنزيمات القطع الخارجية (Exonucleases) التي تقطع الـ DNA من الأطراف.

فضلاً عن ذلك توجد أربعة إنزيمات أخرى مستعملة في الهندسة الوراثية وهي : Bal 31 و Exonuclease III و DNase I و S1-nuclease والتي تختلف عن بعضها من حيث دقة مكان تأثيرها، لذلك فهي توفّر للمهندس الوراثي وسائل مختلفة للتعامل مع الـ DNA (شكل 5 - 5).



شكل (5 - 5). طريقة تأثير بعض الإنزيمات القاطعة

(a) الإنزيم Bal 31 إنزيم مركب له تأثير سريع كإنزيم exonuclease 3' مع تأثير بطيء. كإنزيم Endonuclease. عندما يُضاف هذا الإنزيم بتركيز عالية يقوم بتقصير جزيئات الـ DNA من أطرافها.

(b) الإنزيم Exonuclease III هو exonuclease 3' يُنتج جزيئات لها أطراف 5'.

(c) الإنزيم DNase I يقطع الأشرطة المفردة أو الثنائية من الـ DNA في مواقع عشوائية.

(d) إنزيم S1-nuclease خاص بالأشرطة المفردة سواءً DNA أو RNA.

إنزيمات البلمرة (Polymerases):

تقوم إنزيمات البلمرة بتكوين نسخ من جزيئات الحامض النووي، ويستعمل لوصف إنزيمات البلمرة الاصطلاحان: DNA-dependent أو RNA-dependent إشارة إلى نوع القالب (Template) الذي يستعمله الإنزيم، لهذا

فإن إنزيم بلمرة الـ DNA المعتمد على قالب الـ DNA ينسخ DNA إلى DNA، وإنزيم بلمرة الـ DNA المعتمد على قالب الـ RNA ينسخ RNA إلى DNA، وإنزيم بلمرة الـ RNA المعتمد على قالب الـ DNA ينسخ DNA إلى RNA. وتقوم هذه الإنزيمات بتصنيع الأحماض النووية بإضافة النيوكليوتيدات ذات القواعد المتّمة لقواعد الشريط القالب في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ ، ويشترط لإضافة كل نيوكليوتيدة وجود مجموعة هيدروكسيل ($3' - OH$) حرة لتكوين رابطة الفوسفات ثنائية الأستر. وهذا يستدعي أيضاً وجود منطقة قصيرة من تتابع مزدوج يحتوي على مجموعة هيدروكسيل ($3' - OH$) حرة كبادئ لتسهيل عملية البناء.

بالإضافة إلى البلمرة يقوم الإنزيم DNA polymerase I بنشاط هدم خارجي في الاتجاهات $5' \rightarrow 3'$ و $3' \rightarrow 5'$ ويعمل على تنشيط تفاعل إحلال الأشرطة، إذ يعمل الجزء exonuclease $5' \rightarrow 3'$ على تحلل الشريط السالب، ثم يقوم الجزء الآخر بتصنيع النسخة الجديدة. وتقع أهم استعمالات هذا الإنزيم في عملية ترجمة الثغرة (Nick translation) للتوسيم الإشعاعي.

ويمكن كسر الإنزيم DNA polymerase I وإزالة نشاط الإنزيم $5' \rightarrow 3'$ exonuclease المسؤول عن عملية الهدم للتسلسل في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ وإنتاج ما يُعرف بقطعة كلينو (Klenow fragment) المسؤولة عن عملية البناء في الاتجاه $5' \rightarrow 3'$ بحيث يتم استنساخ جزيء أحادي من الـ DNA. ونظراً لإيقاف وظيفة الإنزيم $5' \rightarrow 3'$ exonuclease لهذا لا يتمكن الإنزيم من تحليل الشريط السالب للـ DNA الثاني خلال مرحلة تصنيع الـ DNA الجديد، وتستعمل قطعة كلينو في التوسيم الإشعاعي بطريقة صناعة البادئ (Primer synthesis) ودراسة التسلسل بطريقة Dideoxy فضلاً عن استنساخ أشرطة الـ DNA المفردة التشكيلات (Recombinants).

ويعمل إنزيم الاستنساخ العكسي RTase (Reverse transcriptase) على إنتاج DNA من RNA بدون نشاط الإنزيمات الخارجية Exonuclease التي تستعمل عادةً في استنساخ جزيئات الـ mRNA لتحضير الـ DNA المكمل (cDNA).

الإنزيمات المحوّرة لأطراف الـDNA:

تؤثر كل من الإنزيمات *Alkaline phosphatase* و *Polynucleotide kinase* و *Terminal transferase* في أطراف جزيئات الـDNA. كما هو واضح من اسم كل من الإنزيمين *Kinase* و *Phosphatase*، فإنها يعملان على إزالة أو إضافة مجاميع الفوسفات مثل الإنزيم البكتيري *BAP* (*Bacterial alkaline phosphatase*)، وكذلك إنزيم أمعاء العجل *CIP* (*Calf intestinal alkaline phosphatase*) اللذان يعملان على إزالة مجاميع الفوسفات من الأطراف 5' للـDNA وترك مجموعة الهيدروكسيل (OH^- 5')، ويستعمل الإنزيم لمنع التحام جزيئات الـDNA غير المرغوب فيها، أو قد يُضاف إلى النهاية 5' للـDNA قبل إضافة الفسفور المشع مع إنزيم *Polynucleotide kinase*.

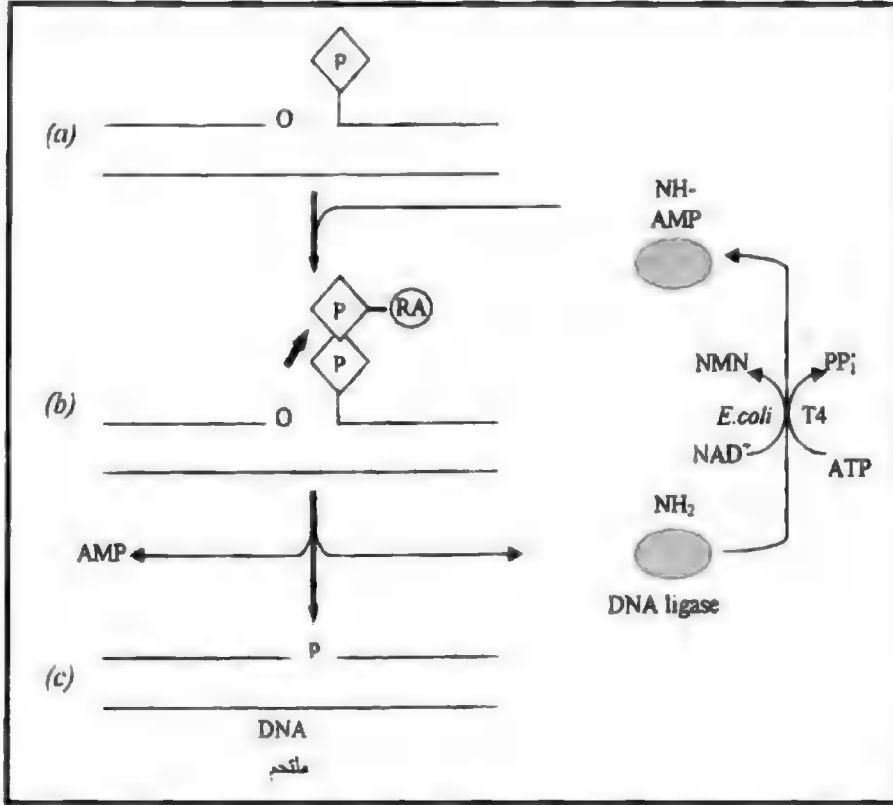
ويُضيف إنزيم النقل الطرفي (*Terminal transferase*) وبشكل مُكرّر نيوكليوتيدات إلى أي نهاية 3' مُتاحة، إلّا أنه يمكن لهذا الإنزيم استعمال نهايات مستوية عن طريق تعديل ظروف التفاعل. وغالباً ما يُستعمل الإنزيم لإضافة البوليمرات المتجانسة (*Homopolymer*) إلى جزيئات الـDNA قبل تكوين الجزيئات المُشكّلة.

إنزيمات اللحام (اللمصق):

إن الـDNA ligase هو إنزيم هام وظيفته إصلاح الأواصر الفوسفاتية ثنائية الأستر المتكسرة إما بشكل عشوائي أو أثناء عملية تكرار الـDNA أو إعادة تركيبه، ويستعمل هذا الإنزيم عادةً في الهندسة الوراثية لغلّق الثغرات المتكوّنة في سلاسل مركب السكر - فوسفات (*Sugar - Phosphate*) في الـrDNA، لهذا يمكن أن نعتبره لصقة جزيئية تستعمل لإلصاق قطع الحامض النووي ببعضها، وهي وظيفة مهمة في إنجاح تجارب الاستئصال (الكلونة).

والإنزيم المستعمل في التجارب غالباً هو الإنزيم *T4 DNA ligase* الذي يُستخلص من خلايا البكتريا *E. coli* المصابة بالفاجات البكتيرية (*Bacteriophage T4*)، فبالإضافة لمقدرته على قفل الفجوات في أطراف النهايات البارزة، فإنه يستعمل أيضاً لربط النهايات المستوية لجزيئات الـDNA ببعضها. ورغم أن هذا الإنزيم يعمل

بصورة جيدة عند درجة حرارة 37°م، ولكن يمكن أن يستعمل أيضاً عند درجات أقل من ذلك (4 - 15)°م، وذلك لمنع التحلل الحراري للأجزاء التي تضم النهايات البارزة لجزئيات الـ DNA ببعضها. وتتضح طريقة عمل إنزيمات اللصق الـ DNA ligase كما في الشكل (5 - 6).



شكل (5 - 6). طريقة تأثير إنزيم DNA ligase

يُلمصق الإنزيم النيوكليوتيدات خلال النهايات (3'-OH) و (5' PO₃-) القريبة من بعضها المفككة (a). تم أدلته (إضافة أدينين) للإنزيم بواسطة NAD⁺ (*E. coli*) أو ATP في حالة الفاج (Phage T4)، ثم يؤدي الإنزيم إلى تكوين الأدينين في مجموعة الفوسفات عند الطرف 5' للرايوز المتكوّن في الشفرة (RA تكون رايوز - أدينين) التي تُمكن من تكوين آصرة فوسفاتية ثنائية الأستر أثناء تكوين النيوكليوتيدات (b و c).

تتمحور أهمية الإنزيمات على قطع وتحوير وربط جزيئات الـ DNA في إعطاء المهندس الوراثي المقدرة على إنتاج جزيئات الـ DNA المركَّب (rDNA) داخل أنبوبة الاختبار دون الحاجة لاستعمال الكائن الحي، ولكن حالما يتم إنتاج قطع الـ DNA التركيبية فإننا نحتاج بعد ذلك إلى أنظمة بيولوجية خاصة تُستعمل لإكثار جزيئات الـ DNA.

الفصل السادس

لمحة عن بعض خطط الاستنسال (الكلونة Cloning)

الفصل السادس

لمحة عن بعض خطط الاستنساخ (الكلونة Cloning)

بعد اختيار مصدر المادة الأولية يتم اختيار منظومة العائل / الناقل مثل بكتريا *E. coli* التي يتوفر عدد كبير من سلالاتها ومواصفاتها الجيدة كعائل. وعند اختيار الناقل لا بُدَّ من إنجاز أمرين مهمين وهما توصيل أجزاء الـ DNA بالناقل ووسيلة لإدخال الجزيئات المشكَّلة (Recombinants) في خلية العائل. ولهذا تحدد منظومة العائل / الناقل في بكتريا *E. coli* لكي تصبح مهمة اختيار منظومة الناقل ونوعية الأجزاء المستهدفة بالاستنساخ ونتيجة التجربة أمراً واضحاً.

الاستنساخ من mRNA:

على الرغم من اشتراك جميع خلايا الكائن الحي الواحد بالجينوم نفسه، فإن كل نوع من أنواع خلايا الكائنات الراقية ينتج mRNA خاصاً به، فبالإضافة إلى تعبير الجينات العامة (Housekeeping genes) اللازمة للعمليات الأيضية الأساسية لجميع الخلايا الحية، هنالك أيضاً خلايا يتم فيها تعبير جينات خاصة بنسيج معيّن، مثل خلايا الكبد وخلايا الكلية وخلايا الجلد... الخ، وكل منها تصنع بروتينات خاصة ناتجة عن الـ mRNA المُميّز لها.

وإضافة إلى وجود الأنماط المختلفة من الـ mRNA الناتجة عن اختلاف أنواع الخلايا، فقد توجد أيضاً مجاميع مختلفة من الـ mRNA متخصصة لها أهميتها في إجراء عملية الاستنساخ يمكن عن طريقها عزل تسلسلات معينة موجودة في الـ mRNA (جدول 6 - 1).

جدول (6 - 1). المجموعات المتوفرة من mRNA

المصدر	عدد جزيئات mRNA المختلفة	وفرة الجزيئات في الخلية الواحدة
متعدد الأدينين Poly (A)+RNA من سايوبلازم كبد الفأر	9	12000
	700	300
	11500	15
متعدد الأدينين Poly (A)+RNA من قناة بيض الدجاج	1	100000
	7	4000
	12500	5

ملاحظة: أوجه اختلاف جزيئات mRNA مُشار إليها بأرقام، هناك mRNA واحد متوفر بنسبة عالية 100000 جزيء في الخلية الواحدة من خلايا قناة نقل البيض في الدجاج، وهو مسؤول عن تشفير بياض البيض (Ovalbumin) الذي يمثل مُعظم بروتين بياض البيض.

صناعة DNA المُكَمَّل (cDNA):

من الصعب استئصال mRNA مباشرة، وإنما يتطلب تحويله أولاً إلى DNA باستعمال إنزيم الاستنساخ العكسي RTase (Reverse transcriptase) لإنتاج الـ DNA المُكَمَّل (cDNA).

والطريقة التقليدية القديمة لصناعة الـ DNA هي ربط سلسلة متعددة الأدينين Poly (A) المتقاطرة عند النهاية 3' للـ RNA ببادئ الثايمين القصير Oligo poly (dT) الذي يُنشئ مجموعة الهيدروكسيل OH- 3' التي يتطلبها الإنزيم RTase (شكل 6 - 1). وفي حالة توفر الأنواع الأربعة من dNTPs والظروف الملائمة يصنع إنزيم الـ RTase نسخة من mRNA ليستج الهجين mRNA\cDNA.

ويمكن انتزاع الـ mRNA خلال عملية التحلل المائي القلوي (Alkaline hydrolysis)، ومن ثم يتحول شريط الـ DNA المفرد إلى شريط مزدوج

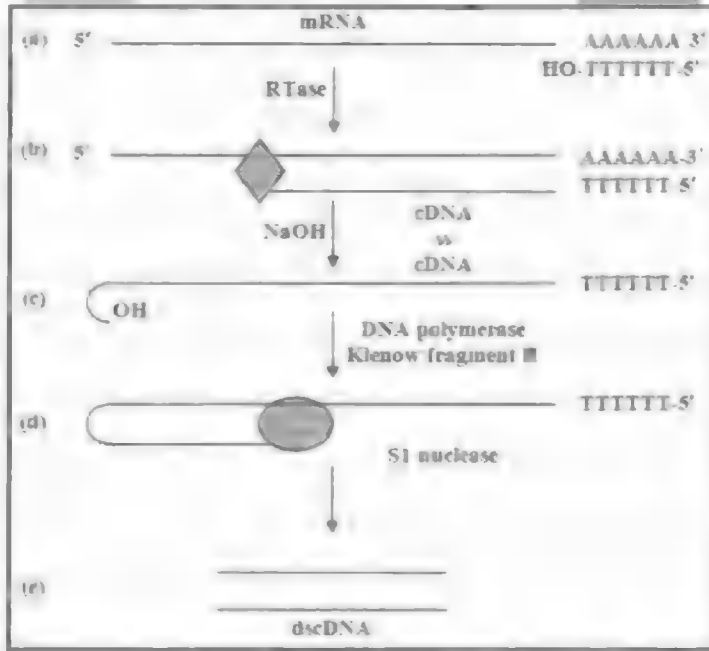
باستعمال إنزيم البلمرة DNA polymerase، وفي هذا الشريط الثاني ينشأ البادئ ذو النهاية الهيدروكسيلية OH-3' بتكوين مناطق قصيرة معقوفة تُشبه دبوس الشعر في نهاية الشريط المفرد. وبعد صناعة الشريط الثاني يتشذب هذا الشريط بواسطة الإنزيم S₁ nuclease لإنتاج جزيء مستوي الأطراف يمكن استنساخه في الناقل المناسب.

هناك عدّة مشاكل قد تظهر باتباع الطريقة المذكورة أعلاه، وهي:

1. عدم الحصول على الطول المناسب للـ cDNA خاصة إذا كان الـ mRNA طويلاً نوعاً ما، وتعدّ هذه مشكلة كبيرة خاصة إذا كان المطلوب هو التعبير الجيني للـ cDNA، لأنه قد لا يحتوي على كل تسلسلات تشفير الجين المُستهدف.

2. هناك بعض المشاكل قد تظهر من جرّاء استعمال الإنزيم S₁ nuclease، فقد ينتزع بعض تسلسلات النهايات 5' أثناء عملية التشذيب.

لقد تغلبت الطرق الحديثة لصناعة الـ cDNA على المشاكل السابقة إلى حدّ كبير، وتتضمن إحدى هذه التعديلات استعمال التذييل باستعمال قطعة السايكوسين (dC) التي تسمح بصناعة الشريط الثاني للـ cDNA الناشئة على أساس بادئ الجوانين Oligo (dG) (شكل 6 - 2). وتُضاف مذيّلات السايكوسين dC إلى النهاية الطرفية 3' للـ cDNA باستعمال إنزيمات النقل الطرفي (Terminal transferase) على الأطراف 3'، وكذلك تفاعلات التذييل، ولهذا يبرز الطول الكامل للـ cDNA الذي لا تنغمر فيه النهاية الطرفية 3' بقالب الـ mRNA.



شكل (6 - 1). صناعة الـ DNA المكمل

يستعمل متعدد الأدينين الـ mRNA Poly (A) كحادة بادئة.

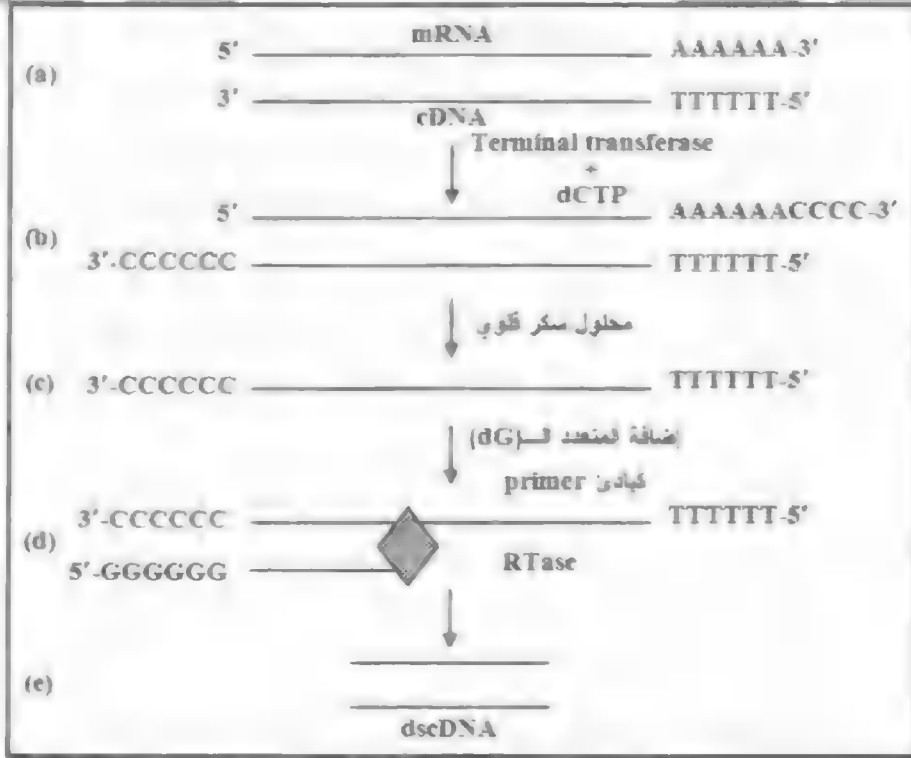
(a) ترتبط القطعة القصيرة (dT) بالنائب المتعدد (A) على الـ mRNA الذي يوقر مجموعة الهيدروكسيل 3'-OH لعملية الاستساخ العكسي لبدء استساخ الحامض.

(b) يُتزع الـ RNA بالتحلل المائي القلوي يُعطي جزيء شريط مفرد من الـ cDNA.

(c) شريط مفرد قصير معقوف على هيئة دبوس شعر به مجموعة هيدروكسيل 3'-OH طرفية.

(d) تصنع شريط ثاني بمساعدة إنزيمات بلمرة الـ DNA (T4 Polymerase)، قطعة كلبنو (RTase أو Klenow).

(e) يتم تشذيب الـ cDNA ثنائي الشريط بوساطة الإنزيم S₁ لإنتاج نهايات مستوية (مصمتة). وعوضاً عن الخطوة التي يستعمل بها التحلل المائي القلوي يستعمل الإنزيم RNase H الذي يصنع شراً في شريط الـ mRNA للهجين الـ mRNA-cDNA. بوجود الإنزيم DNA polymerase I يتم تصنع الشريط الثاني للـ cDNA بوساطة ترجمة الشفرة.



شكل (6 - 2). بناء cDNA باستعمال طريقة متعددة الجوانين (dG) Oligo

(a) تكوين الشريط الأول كما هو مبين في الشكل السابق مكونة للهيكل mRNA\cDNA.

(b) تذييل بالقاعدة سايتوسين C باستعمال الإنزيم Terminal transferase.

(c) التجزئة باستعمال محلول السكرز القلوي الذي يحلل mRNA ويسمح بإعادة استعمال الطول الكامل لجزيئات cDNA.

(d) البادئ متعدد الجوانين (dG) Oligo يلتحم بالذنب C، ومن ثم يستعمله إنزيم Reverse transcriptase لتكوين الشريط الثاني.

(e) يتج عنه جزيء كامل من cDNA ثنائي الأشرطة.

المكتبة الجينومية:

تؤدي عملية استنساخ DNA إلى صناعة جزيئات rDNA وإدغامها في نواقل بلازميدية أو فاجية يتم الاحتفاظ بها أما في خلايا بكتيرية أو في جزيئات فاجية،

وهذا ما يُطلق عليها اصطلاح بنك الاستنسال (Clone bank) أو المكتبة الجينومية (Genomic library) التي تمثل الجينوم الكلي أو المخزون الوراثي الكامل للكائن.

والمكتبة الجينومية الجيدة يجب أن تشمل أو تمثل كامل أو غالبية الجينوم للكائن في صورة طاقم متداخل من القطع المتداخلة أنتجت بطريقة عشوائية، ويمكن المحافظة عليها بصورة مستقرة، وعند تكوين المكتبة الجينومية يُراعى أولاً عدد النسخ المطلوبة التي يحددها حجم الجينوم، فجينوم بكتريا الـ *E. coli* يتطلب نسخاً أصغر من نسخ جينوم الإنسان مثلاً، وكذلك نوع الناقل المستعمل والذي يحدد حجم القطع المستنسله أيضاً.

إن عدد النسائل المسوَّحة في العادة يُحدد قبل التجربة. هناك عدد من العوامل يجب أن تؤخذ بنظر الاعتبار سيتم الإشارة إليها بالمعادلة التالية والتي تستعمل لتحديد عدد النسائل، وهي كالآتي:

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f/g).$$

حيث إن N : هي عدد النسائل المسوَّحة (The number of clones screened).

P : هي احتمالية عزل الجين (The probability of isolating the gene).

f : هي حجم القطعة (The fragment size).

g : حجم الجينوم المنصف (The size of the haploid genome).

من هذه المعادلة يمكن تحديد N وهو عدد النسائل التي يجب أن تُختبر لإيجاد التسلسل المعين. وهي كذلك تظهر بأن على الباحث تضبيب متغيرين وهما ما يسمى باحتمالية إيجاد الجين (بالتأكيد ليس 100٪)، وكذلك حجم القطع. فمثلاً نفترض وجود فطر ذو جينوم منصف 9×10^7 قاعدة. وبعد الهضم الجزئي قد عزلنا قطع بحجم 5000 قاعدة. فإذا كنا نريد فرصة 95٪ لإيجاد التسلسل (على افتراض بأن التسلسل المطلوب أصغر من 5000 قاعدة)، وعليه يكون الحساب كالآتي:

$$N = \ln(1 - 0.95) / \ln(1 - (5000 / 9 \times 10^7)).$$

وفي هذا $N = 53,922$ نسيلة. وهذا العدد يمثل عدد النسائل (المستعمرات) التي يجب أن تختبر لإيجاد تسلسل مستهدف سليم. إن تغيير هذه المعايير يؤدي إلى تغيير عملية المسح. وعلى سبيل المثال فإن زيادة الاحتمالية لكي تكون ناجحة بنسبة 99٪ يزيد من عدد النسائل إلى 82,890. كما أن زيادة حجم القطعة من 5000 إلى 20,000 قاعدة وباحتمالية 95٪ يؤدي إلى خفض عدد النسائل إلى 13,479 (جدول 6 - 2).

جدول (6 - 2). يمثل جينومات كائنات معينة والمستلزمات المسحية لقطع بحجم 10 kb باحتمالية نجاح 95٪

النسائل المسوحة Colonies screened (N)	حجم الجينوم Genome size (g)	الكائنات الحية
1	$10^3 \times 3.1$	فيروس M 13 phage
1840	$10^6 \times 4.0$	بكتريا <i>E. coli</i>
6200	$10^7 \times 1.35$	خميرة الخبز <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
82,200	$10^8 \times 1.8$	ذبابة الفاكهة <i>Drosophila melanogaster</i>
735,998	$10^9 \times 1.6$	نبات التبغ Tobacco
1,288,008	$10^9 \times 2.8$	الإنسان Human
6,900,688	$10^{10} \times 1.5$	نبات الذرة <i>Zea mays</i> (corn)

تحضير قطع الـ DNA:

إن الحصول على الـ DNA وتوفيره بكمية كافية يُعدّ الخطوة الهامة في صناعة المكتبة الجينومية، ولنفترض أننا سنستعمل أحد نواقل لامدا، مثل الناقل EMBL4، فإن هذا الناقل هو من النواقل الإحلالية (الاستبدالية Replacement) سعته القصوى حوالي 22 كيلو قاعدة. ومن الصعب أن نحدد حجماً محدداً من التركيبات باستعمال هذا الناقل، بل سيُتج لدينا في تجربة الاستنساخ أحجاماً مختلفة تتراوح من 17 إلى 23 كيلو قاعدة، ولهذا يُفضل عدم صناعة قطع أصغر لتفادي حدوث الأخطاء. لهذا يُراعى عند تحضير أجزاء

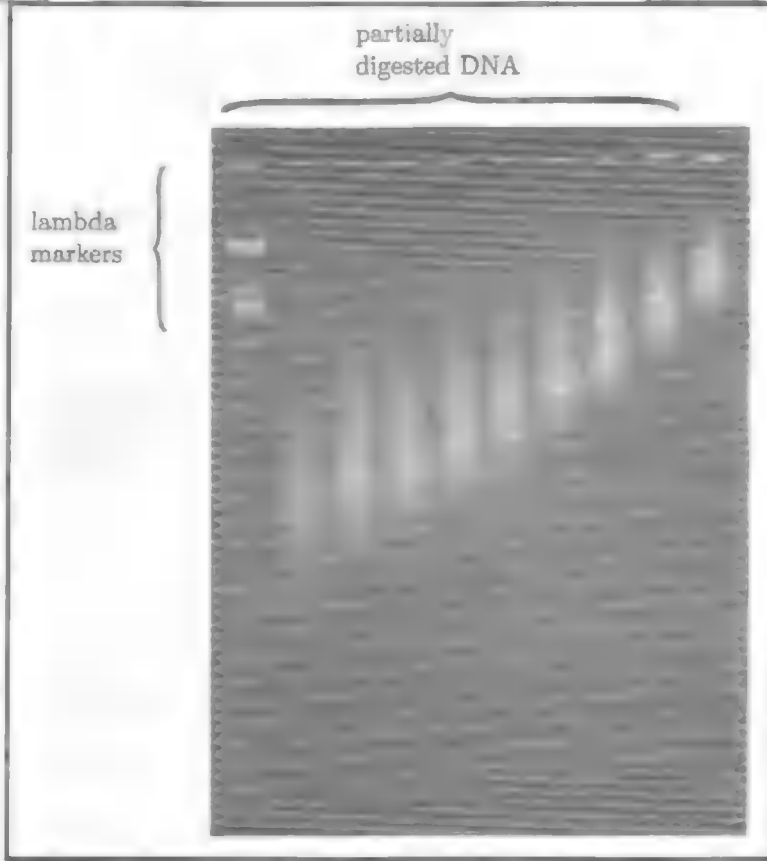
الـ DNA المستهدفة بالاستئصال كل من الوزن الجزيئي وطريقة تقطيع وتجزئة الـ DNA المُحصَر للتجربة، ونحرص دائماً على استخلاص كمية من الـ DNA لا تقل عن 100 كيلو قاعدة للتغلب على الصعوبات التقنية التي قد نواجهها، وأن نتعامل بلطف حتى لا تنكسر جزيئات الـ DNA أثناء عمليات السحب والمزج التي تتعرض لها.

بعد استخلاص الـ DNA يُقَطَّع ميكانيكياً إما بتمريره خلال إبرة الحقن أو عن طريق الموجات الصوتية (Sonication) التي تُنتج جزيئات مستوية الأطراف تحتاج إلى معالجة لتشكيل الأطراف بإضافة توصيلة أو معشَق (Adapter) أو سلسلة من القواعد المتجانسة التي تكون نهايات بارزة مما يساعد على الالتصاق بالناقل.

وقد يستعمل الهضم الإنزيمي للمكتبة الجينومية وينتج عنها تسلسلات مختلفة عن بعضها تماماً، لأن عملية القطع الإنزيمي تحدث فقط في مواقع التميز. ولهذا تستعمل هذه الطريقة مع التعديل مع مراعاة العيوب الآتية:

1. يتكرر موقع القاطع السداسي مثل الإنزيم *EcoRI* مرة بعد كل حوالي 4096 زوج قاعدة (bp) وينتج عن ذلك قطع صغيرة بالنسبة لناقل لامتداد الإحلالية.

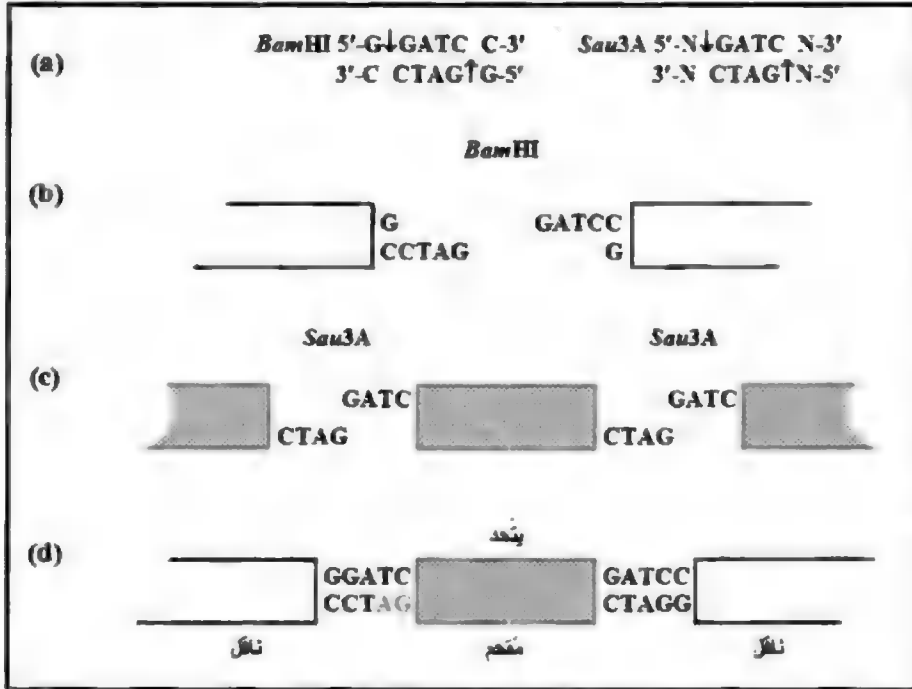
2. أي انحراف في التسلسل قد يؤدي إلى انحراف توزيع مواقع تعرف الإنزيمات وتتكون مناطق في الجينوم إما أن تحتوي على مواقع إنزيمية قليلة أو فائض منها. وهذا يعني أن الهضم الكامل سيكون غير ملائم لتوليد المكتبة المطلوبة، ولكنه إذا تم الهضم الجزئي باستعمال إنزيم قطع رباعي مثل *Sau3A* والذي يقطع حلزون الـ DNA مرة واحدة كل 256 bp فإن ذلك سيُنتج مجموعة من القطع العشوائية بحيث يمكن إتمام ذلك عن طريق تغيير تركيز الإنزيم أو وقت الهضم، وأن اختبار الترحيل الكهربائي سيُنتج حصيلة هضم تحتوي على أشكال مختلفة الحجم والتوزيع (شكل 6 - 3).



شكل (6 - 3). الهضم الجزئي للـ DNA

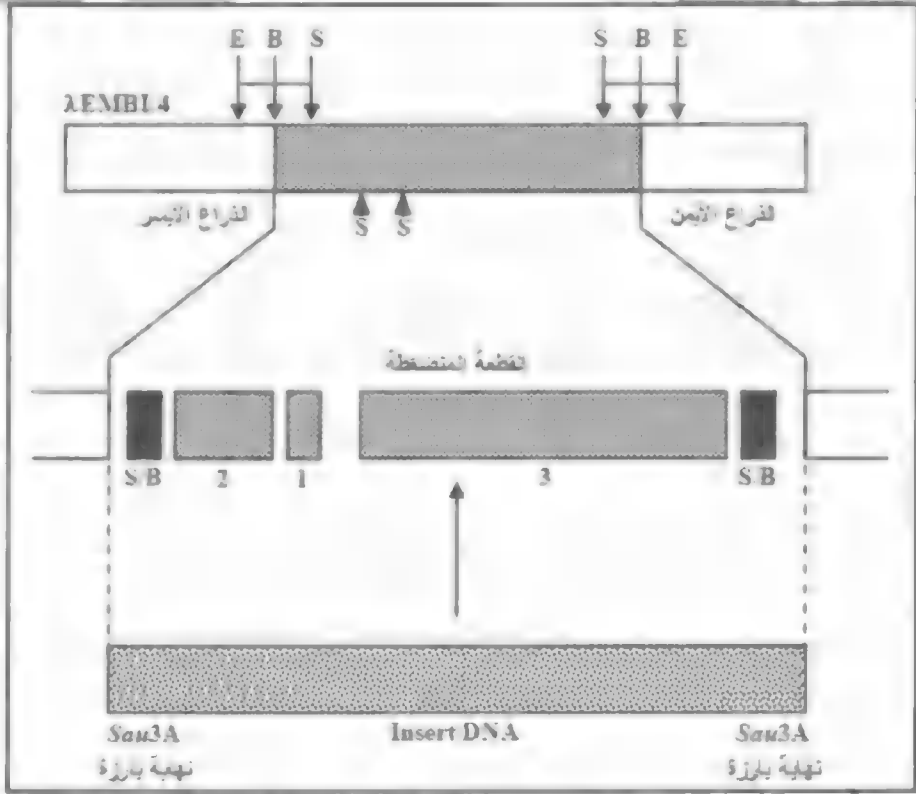
إكثار المكتبات الجينومية:

لنفترض أننا هيأنا الظروف المناسبة للهضم الجزئي لعينة الـ DNA فينبغي تجهيز العينة بعد ذلك بتفتيتها أولاً بالطرد المركزي (التدرج الكثافي)، ثم تفردّها بالترحيل الكهربائي، ويتم اختيار القطع المناسبة التي تتراوح من 17 إلى 23 كيلو قاعدة (kb). فإذا استعمل الإنزيم *Sau3A* أو الإنزيم *MboI* الذي له تسلسل القطع نفسه، يمكن بعد ذلك إقحام الأجزاء في موقع *Bam HI* في الناقل λ EMBL4 (أنظر الشكلين 6 - 4 و 6 - 5). والجزء المُقحم قد يعامل بإنزيم الـ *Phosphatase* لتقليل احتمالية الالتصاق الذاتي أو تكوين المتسلسلات المتكررة (Concatmer).



شكل (6 - 4). استئصال قطع $Sau 3A$ في مواقع الإنزيم $Bam HI$

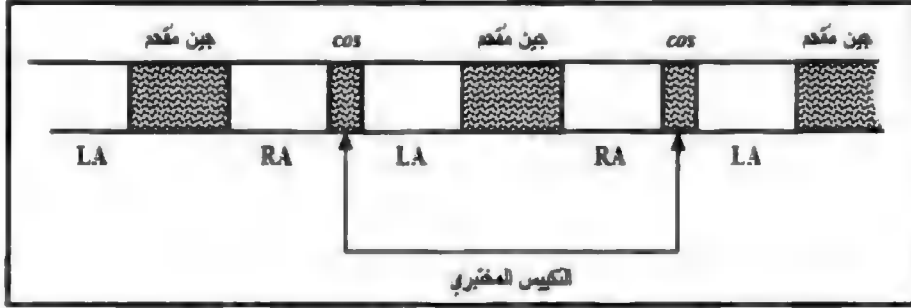
- (a) مواقع القطع للإنزيمين $BamHI$ و $Sau3A$. في موقع الإنزيم $Sau3A$ N يمثل آية قاعدة.
- (b) DNA الناقل مقطوع بالإنزيم $BamHI$ ليتج عنه أطراف 5' بارزة مع تتابع القواعد 5'-GATC-3'.
- (c) جزء DNA المقحم بالإنزيم $Sau3A$ ويتج أيضاً أربع قواعد بارزة متممة.
- (d) يمكن أن يتحد DNA المقطوع بالإنزيم $Sau3A$ مع النهايات البارزة اللاصقة المتكوّنة بالإنزيم $BamHI$ لتتج جزئي rDNA.



شكل (5 - 6). لصق قطعة DNA المقطوعة بالإنزيم *Sau 3A* في الناقل لامدا *EMBL4* الاستبدالي

المواقع على الناقل *EcoRI* (E). *BamHI* (B). *SalI* (S). يقطع الناقل بالإنزيم *BamHI* و *SalI* اللذان يتجان خمس قطع من القطعة المنضغطة المظلمة في القطعة العلوية. إزالة القطع الصغيرة *BamHI* / *Sau3A* المشار إليها بالصناديق السوداء (S/B) يمنع القطعة المنضغطة من أن تتحد مرة أخرى، فضلاً عن ذلك فإن الموقعين الداخليين للإنزيم *SalI* يشقان القطعة المنضغطة ليتكوّن ثلاث قطع *SalI* / *SalI* (1 - 3). ويمكن إزالة القطع الصغيرة من المستحضر بالتسريب بإضافة Isopropanol الذي يترك القطع الصغيرة على وجه المحلول. بإزالة القطعة المنضغطة يمكن أن توصل قطعة DNA المهضومة بالإنزيم *Sau3A* في الموقع *BamHI* للناقل (أنظر الشكل 6 - 4). ويمكن هضم الناقل بالإنزيمين *BamHI* و *SalI* لإنشاء النهايات الالتصاقية البارزة الصالحة للاستئصال، وفصل القطعة المنضغطة ومنعها من إعادة الالتصاق

الذاتي. وعند إتمام عملية اللصق ينتج عن ذلك متسلسلات متكررة في DNA المركب، التي تُعدّ المادة الحاتّة لعملية التكتيس المختبرية (*Packaging in vitro*) كما هو مُبيّن في الشكل (6 - 6)، وهذا ما يُعرف بالمكتبة الأولية (*Primary library*)، وهو أهم المكاتب الجينومية المُعدّة للحصول على التسلسل المطلوب.



شكل (6 - 6). الـ DNA التركيبي (rDNA) المتسلسل

في حالة لصق أجزاء الـ DNA في ناقل مثل λ EMBL4 تتكوّن به متسلسلات متكررة لها الذراع الأيسر للناقل (LA)، الـ DNA المقحم، الذراع الأيمن (RA) وتتكرر مكونات هذه الوحدة عدّة مرات وترتبط ببعضها في الموقع *cos* بالنهايات البارزة على ذراعي الناقل، ويتم شق الجينوم التركيبي عند الموقع *cos* ومن ثمّ يتكتّس في رؤوس الفاجات.

نحتاج أحياناً إلى تمهيط وكشف المكتبة الجينومية بالكامل للحصول على الجينات المختلفة، وقد نضطر إلى إرسال عينات منها إلى عدّة مختبرات أخرى لتسريع إنجاز المهمة، ولذلك يتحتّم ضرورة إكثار المكتبة بزرع الفاجات الناقلة للـ DNA على سلالة مناسبة من عوائل البكتريا *E. coli* وعمل مُعلّق من البكتريا ويحفظ تحت ظروف مناسبة لتوزيعه على الباحثين والمختبرات بشكل سليم.

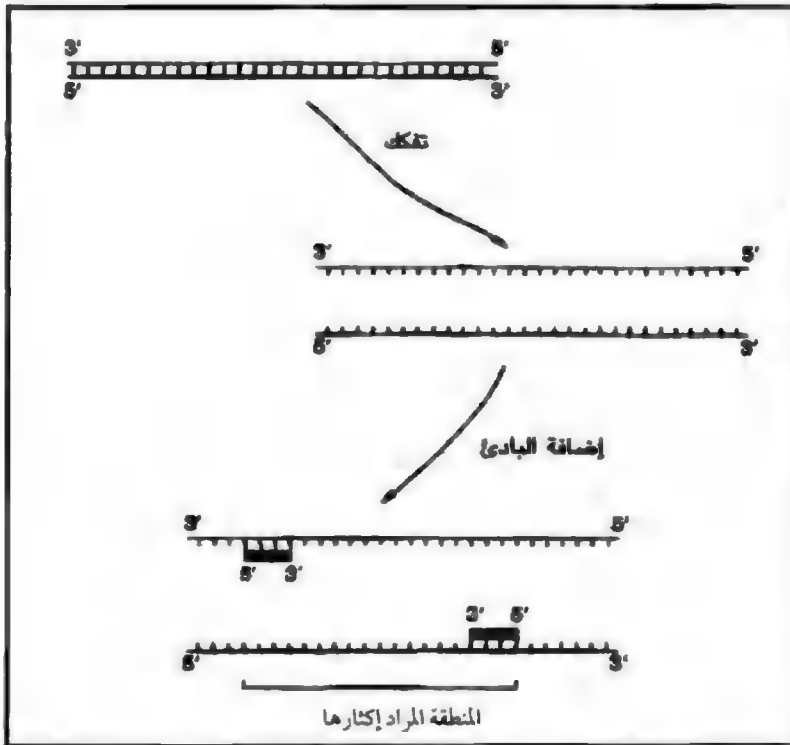
تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل PCR (*Polymerase chain reaction*)

لقد أدّى تطوير تقنيات استنسال الجين سنة 1970 إلى إنعاش البحث العلمي وتقدّم دراسة الجين، ثمّ تلى ذلك خطوة أخرى مشابهة في منتصف ثمانينيات القرن الماضي، أحدثت ثورة حقيقية في علم البيولوجيا تمثّلت في اختراع ما عُرف بسلسلة تفاعلات إنزيم البلمرة PCR (*Polymerase chain reaction*) من قبل Kary Mullis

الذي حصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993 لهذا الاختراع، والذي تميّز بسهولة تطبيقه ونجاحه في استنساخ جزيء الـ DNA أو جين معين بمساعدة إنزيم البلمرة DNA polymerase، وقد اتسعت تطبيقات هذا الإجراء في الأبحاث الوراثية وأفرع العلوم البيولوجية الأخرى.

نظرة عامة:

يُستعمل إجراء البلمرة (PCR) لتكبير قطعة معينة من الـ DNA اعتماداً على معرفة السلاسل النيوكليوتيدية لأطراف القطعة المستهدفة بالاستنساخ لصناعة قطعتين صغيرتين تسمى كل منها بادئ (Primer) لتلحمان بطرفي السلاسل النيوكليوتيدية، ثم تبدأ بصناعة السلسلة المكتملة للـ DNA (شكل 6 - 7).

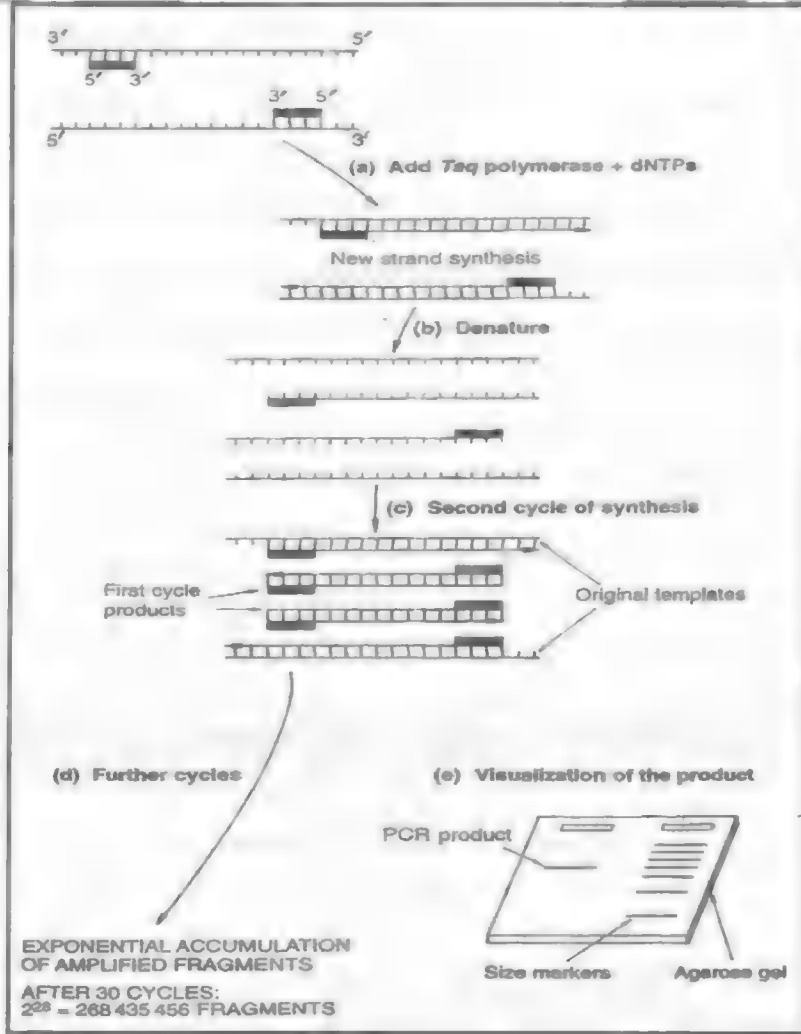


شكل (6 - 7). التهجين الجزيئي للبادئين مع قالب الـ DNA في بداية عملية البلمرة (PCR)

ويتم التكبير عادةً باستعمال إنزيم البلمرة DNA polymerase المُستخرج من البكتريا *Thermus aquaticus* وهي البكتريا نفسها التي تُنتج الإنزيم *TaqI* التي تعيش في الفوارات الساخنة وتحتوي على إنزيم البلمرة *Taq polymerase* الذي يقاوم التأثيرات الحرارية العالية.

ولبدء عملية البلمرة أو سلسلة تفاعلات إنزيم البلمرة (PCR) يُضاف الإنزيم إلى القالب البادئ من الـ DNA ثم يُحْضَن المِزِيج حتى تتكوّن الجداثل التكاملية الجديدة (شكل 6 - 8 - a)، ثم يُسَخَّن المخلوط إلى درجة 94 درجة مئوية لكي تنفصل الجداثل المُصنَّعة حديثاً من القالب Template (شكل 6 - 8 - b)، ثم تبرّد بحيث تتمكّن بادئات أخرى من التهجين في المواقع الخاصة بها، بما في ذلك الأماكن الواقعة على السلاسل المُصنَّعة. وتبدأ دورة صناعة الـ DNA مرة أخرى (شكل 6 - 8 - c)، وتتكرّر عملية التفكيك والتهجين من 25 إلى 30 مرة مُنتجة في النهاية مئات الملايين من قطع الـ DNA المُكَبَّرَة (شكل 6 - 8 - d).

تُفحص نتيجة التفاعل عن طريق الترحيل الكهربائي، وتظهر القطع على هيئة حُزْم منفصلة مصبوغة بصبغة بروميد الإيثيديوم (Ethidium bromide) (شكل 6 - 8 - e). ولهذا يقدّم إجراء البلمرة (PCR) معلومات كثيرة عن جزيء الـ DNA المُكَبَّر. ويمكن وضع النواتج في البلازميد أو الفاج البكتيري ويُستنسَخ ثم تُقرأ قواعد بالطرق المعتادة.



شكل (6 - 8). مراحل تقنية الـ PCR.

(a) إضافة إنزيم *Taq* polymerase والنوكليوتيدات الأربع.

(b) المسخ (فتح الأشرطة).

(c) الدور الثانية من التصنيع.

(d) دورات إضافية.

(e) إظهار المنتج بالترجيل الكهربائي.

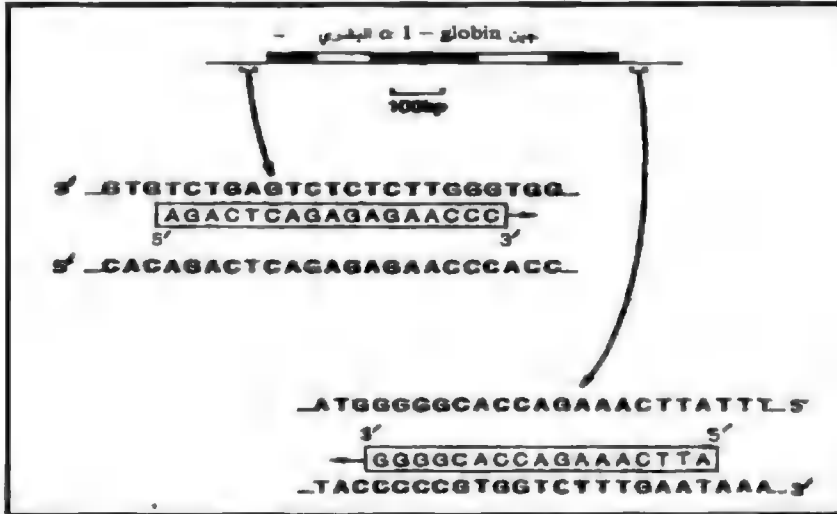
خطوات إجراء البلمرة (PCR):

يتوقف نجاح تجربة البلمرة على مدى دقة تصميم البادئين (Primers)، وكذلك ضبط درجات حرارة التسخين والتبريد في دورة التفاعل. والبادئ هو عبارة عن سلسلة نوكلويدية قصيرة تتكامل مع سلسلة الـ DNA المفردة، ويكون معها جديلة ثنائية بمساعدة إنزيم البلمرة DNA polymerase، ولهذا يُصنع لكل سلسلة من سلسلتي الـ DNA بادئ خاص بها.

تصميم البادئين:

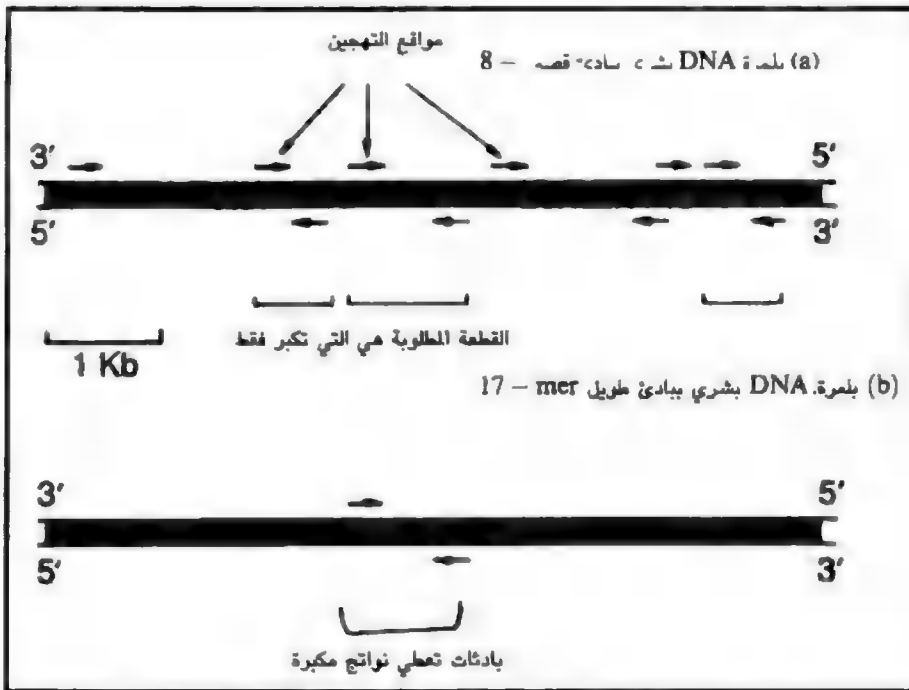
يمثل البادئان عوامل النجاح أو الفشل لتجارب البلمرة، فالبادئ المُصمَّم بدقة يتكامل مع متواليّة القالب دون أي مشاكل، ما عدا ذلك فإن التجربة حتماً إما أن تفشل تماماً، أي لا تتكوّن نواتج PCR، أو تتكوّن قطع خاطئة.

وكل بادئ يجب بالطبع أن يكون مُكتملاً (وليس مشابهة) لسلسلة القالب لكي يتهجّن معها (شكل 6 - 9)، ويُفضّل أن تكون القطعة المستهدفة بالتكبير لا تتجاوز 3 كيلو قاعدة، لأنه كلما زاد حجم القطعة كلما قلت كفاءة التكبير.



شكل (6 - 9). بادئين مصممين لتكبير جين $\alpha 1$ -globin أكسونات الجين مُبيّنة على هيئة صناديق مغلقة، والأنترونات على هيئة صناديق مفتوحة

ويجب أيضاً ضبط طول البادئ، فإذا كان قصيراً فقد يتجهّج أو يلتحم مع مواقع غير مرغوبة، فلنتخيل أننا نتعامل مع الـ DNA البشري، ولدينا بادئين طول كل منهما 8 قواعد (8-mer) فستكون النتيجة مجموعة كبيرة من القطع، (شكل 6 - 10 - a) نتيجة لحدوث مواقع التحام مختلفة بمعدل واحد لكل $4^8 = 65536$ زوج قاعدة، ويتكوّن تقريباً 46000 موقع في 3000000 كيلو قاعدة، وهي التي تمثّل الجينوم البشري. أما لو استعمل بادئ يتكوّن من 17 نيوكليوتيدة، نتوقّع حدوث التحام كل $17179869184 = 4^{17}$ زوج قاعدة، وهذا أكبر من طول الجينوم البشري بخمس مرات، ونتوقّع أن البادئ يلتحم مرّة واحدة في الـ DNA البشري الكلي، ولا يُعطي البادئ (17-mer) إلا قطعة مُكبّرة واحدة ليس أكثر (شكل 6 - 10 - b).



شكل (6 - 10). أطوال البادئات مهمة لإجراء دقيق للـ PCR

وتُقاس فاعلية الـ DNA بعدد الجزيئات المكبرة الناتجة عن التجربة، فهي تقل إذا زاد طول البادئ نتيجة لعدم حدوث الالتحام التام في الوقت المحدد خلال دورة التفاعل، ولهذا نادراً ما يُستعمل بادئ أطول من 30 نيوكليوتيد (30-mer).

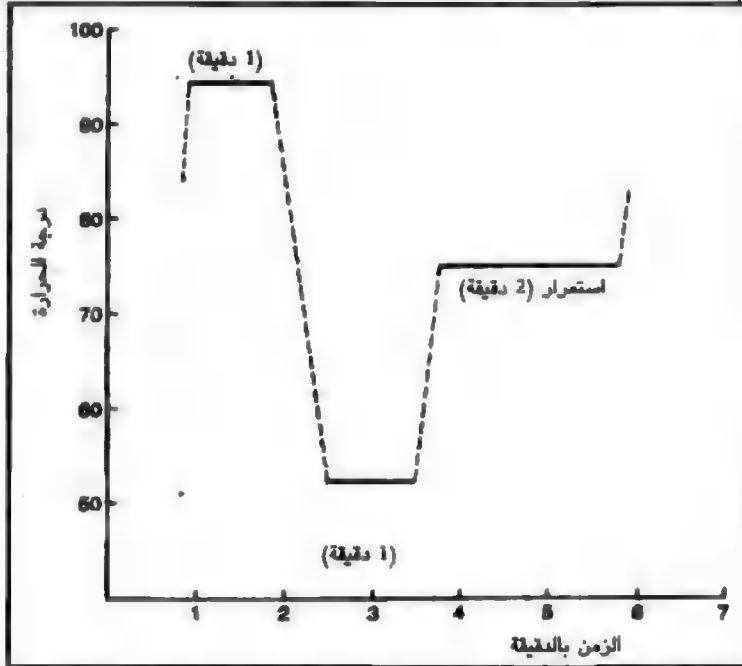
ضبط درجات حرارة الـ PCR:

يتعرض محلول التفاعل أثناء دورة الـ PCR إلى ثلاث درجات حرارية مختلفة (شكل 6 - 11) كالآتي:

1. درجة حرارة التفكيك Denaturation وهي حوالي 94°م والتي تعمل على تفكيك القواعد الثنائية للـ DNA لتكوّن سلاسل مفردة تعمل كقوالب في الدورة التالية لصناعة الـ DNA.

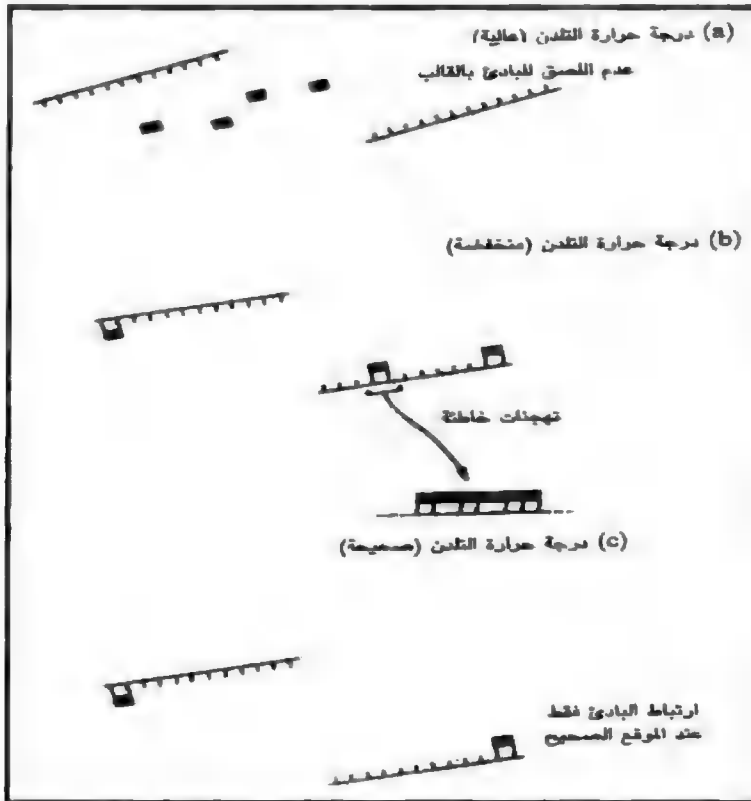
2. درجة حرارة التهجين أو التلدن التي تساعد على التحام البادئات مع قوالب الـ DNA.

3. درجة حرارة الاستطالة وصناعة الـ DNA وهي عادةً 74°م وأقل من الدرجة المثلى للإنزيم Taq polymerase.



شكل (6 - 11). درجة الحرارة المثالية في إجراء الـ PCR

وتعتبر درجة حرارة التلدين Annealing هي المرحلة المهمة، لأنها تؤثر في تهجين جزيئات الـ DNA مع البادئ، فإذا كانت درجة الحرارة عالية جداً فلا يحدث أي تهجين بل يبقى كل من البادئ والقالب بمعزل عن بعضهما (شكل 6 - 12 - a). أما إذا كانت درجة الحرارة منخفضة جداً فلن تتوافق التهجينات، أي لا تتوافق عملية التزاوج القاعدي (شكل 6 - 12 - b)، ويعني ذلك أن حساب طول البادئ غير صحيح. أما إذا تمت عملية التلاحم عشوائيًا فإن مواقع التهجين لكل بادئ عشوائي يتزايد بشكل كبير، وتتكون مواقع غير صحيحة، ولهذا يجب أن تكون درجة الحرارة منخفضة بقدر يكفي فقط لعملية الالتحام ومرتفعة بقدر يكفي فقط لمنع التهجينات غير الصحيحة بين البادئ والقالب (شكل 6 - 12 - c)، وتُحسب هذه الدرجة عن طريق تقدير درجة ذوبان (Melting temperature T_m) وهي درجة الحرارة التي تتفكك عندها القواعد الثنائية بالكامل.



شكل (6 - 12). درجة الحرارة لها تأثير مهم على عملية تهجين البادئ مع قالب الـ DNA

ويمكن تقدير درجة حرارة التفكك T_m من المعادلة البسيطة التالية (شكل 6 - 13):

$$T_m = ([T + A] \times 2) + ([G + C] \times 4).$$

حيث $[G + C]$ تمثل مجموع قواعد السايتوسين والجوانين، و $[T + A]$ تمثل مجموع قواعد الثايمين والأدينين في سلسلة البادئ.

ولهذا تُحسب درجة حرارة التلذّن بحساب درجة الانصهار T_m لكل بادئ، وتستعمل درجة أو درجتان أقل من القيمة الناتجة لتأكيد عملية التهجين الصحيحة، وهذا يعني ضرورة دقة تصميم البادئ بحساب درجة الانصهار بشكل صحيح، وأن تكون واحدة لكلا البادئين.

البادئ: 5'AGACTCAGAGAGAACCC3'			
4Gs	5Cs	7As	1T
T_m	$= (4 \times 9) + (2 \times 8)$		
	$= 36 + 16$		
	$= 52^\circ\text{C}$		

شكل (6 - 13). حساب درجة حرارة الانصهار T_m للبادئ

دراسة نواتج البلمرة (PCR):

يُمثل إجراء البلمرة نقطة البداية لمجموعة كبيرة من التجارب والتحليل التي تهدف إلى الحصول على المعلومات الأكيدة عن جزيء الـ DNA، وعلى الرغم من وجود الطرق المتعددة لدراسة نواتج البلمرة، إلا أن أهمها ما يأتي:

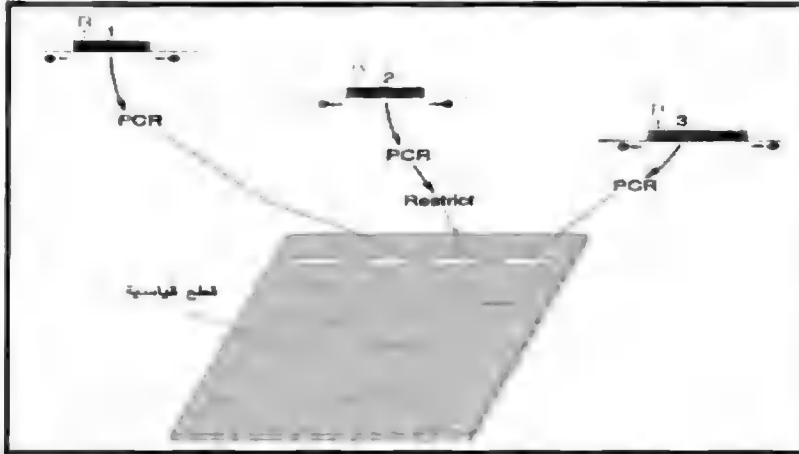
- * الترحيل الكهربائي لنواتج البلمرة.
- * تحديد تتابع نواتج البلمرة.
- * تحليل (استنسال) نواتج البلمرة.

(أ) الترحيل الكهربائي لنواتج البلمرة:

تُفحص نواتج البلمرة عن طريق الترحيل الكهربائي هلام الأجاروز وفحص حُزم الـ DNA المصبوغة بمادة بروميد الإيثيديوم في الهلام المُعرّض للأشعة فوق

البنفسجية. وفي حالة ضعف النواتج فإننا نستعمل تهجين سودرن. وعند عدم ظهور الحزمة المتوقعة أو ظهور حزم زائدة فإن هذا يعني أن هناك خطأ ما قد حدث ويجب إعادة التجربة. وفي بعض الحالات يستعمل الترحيل الكهربائي ليس فقط للتأكد من صحة التجربة، وإنما للحصول على معلومات إضافية مثل المواقع الإنزيمية في القطع الناتجة عن التجربة، إذ يُعامل الناتج بإنزيمات القطع الداخلية (Endonucleases) ثم تُفحص بالترحيل الكهربائي.

وعوضاً عن ذلك يمكن استعمال الحجم الصحيح لنواتج البلمرة لإثبات ما إذا كان قالب الـ DNA يحتوي على جزء مُقحم أو طفرة إلغاء في الجزء المُبلر أو المُكَبَّر (شكل 6 - 14). وفي كلتا الحالتين يستعمل إجراء الـ PCR كإجراء يُفضَّل عن إجراء الـ RFLP، لأنه يمكن أن يُطبَّق مع كمية قليلة جداً من الـ DNA، وهذا يعكس أهمية إجراء البلمرة وقدرته كوسيلة كشف تقنية عالية الفعالية.



شكل (6 - 14). الترحيل الكهربائي لنواتج الـ PCR يمكن أن تقدّم معلومات عن جزيء قالب DNA

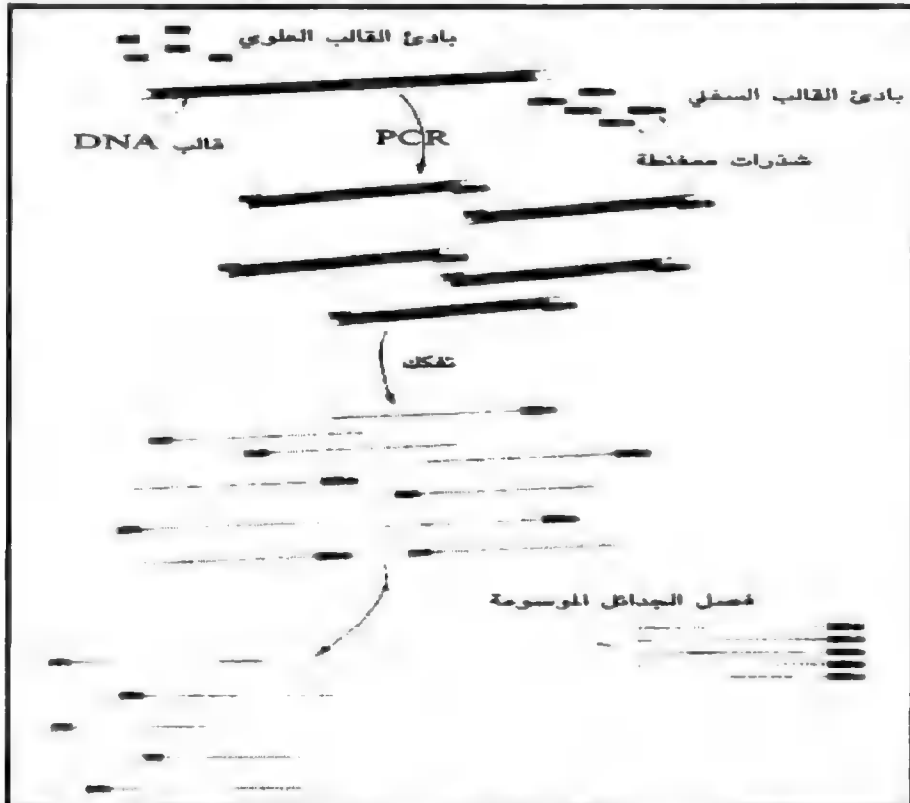
المجال 1 يُبين نواتج PCR غير مُعاملة بإنزيم القطع.

المجال 2 يُبين نواتج PCR مُعاملة بالإنزيم الذي يقطع الموقع R.

المجال 3 يُبين النتيجة المُحصَّل عليها عندما يحتوي DNA القالب على جزء مُضاف في المنطقة المُكَبَّرَة.

(b) تحديد تتابع نواتج البلمرة:

إذا لم نحصل من الترحيل الكهربائي على معلومات كافية فإننا نلجأ إلى إجراء قراءة قطعة الـ DNA الناتجة عن عملية البلمرة، وذلك باستئصال الناتج من تجربة الـ PCR كما سنرى لاحقاً، ثم سلسلة المتواليات بالطرق المعتادة أو بالطريقة المباشرة المعتمدة على إجراء سانجر وكولسون (Sanger-Coulson). تتكوّن نواتج البلمرة على شكل DNA ثنائي، ولذلك نحتاج إلى سلاسل مفردة حتى تتم القراءة. ولإتمام إجراء البلمرة لدينا عدّة خيارات، أفضلها استعمال بادئين أحدهما عادي والآخر محور بطريقة تسهل تنقيته باستعمال شدادات مغناطيسية تلتصق بسلسلة القواعد، وتنفصل الجديلة الممغنطة عن الجديلة العادية للحصول على DNA مفرد (شكل 6 - 15).

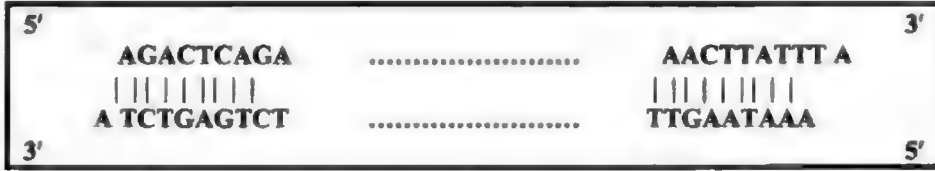


شكل (6 - 15). طريقة لتنقية الـ DNA أحادي الجديلة من نواتج الـ PCR ثنائي الجديلة

هناك طريقة أخرى مشابهة يستعمل فيها البادئ المُعلّم بالبايوتين، إذ تنفصل الجديلة المفردة بإضافة بروتين الأفيدين الذي يحافظ على انفرادية وانفصال الجديلة. وعندما نستخلص جديلة الـ DNA المفردة نُتم بقية الإجراء، وهو مُشابه لطريقة سانجر وكولسون لسلسلة الـ DNA، إذ تصنع سلسلة الجزيئات من السلسلة المنتهية (Chain terminated) عن طريق أحد إنزيمات البلمرة مثل إنزيم (Sequenase). ويولى الاهتمام بمعرفة سلسلة البادئ المستعمل كنقطة بداية لتفاعلات صناعة الجديلة، ففي إجراء السلسلة يتلذّن أو يرتبط هذا البادئ في موقع محدّد من الناقل الفاجي M13 قُرب الموصل (Polylinker) ويستنسخ فيه الـ DNA المُستهدف بالقراءة أو السلسلة. هذا البادئ لا يمكن استعماله مع نواتج البلمرة، لأنها لا تحتوي على متواليات أو سلاسل الناقل الفاجي M13 المناسبة، ولكن عوضاً عن ذلك يمكن الاستعانة بأحد البادئين المستعملين لبداية البلمرة في بدء تفاعلات قراءة المتواليات أو السلسلة، وهذا البادئ يجب أن يتكامل مع الجداول المفردة المستخلصة.

(ع) استنسال نواتج الـ PCR:

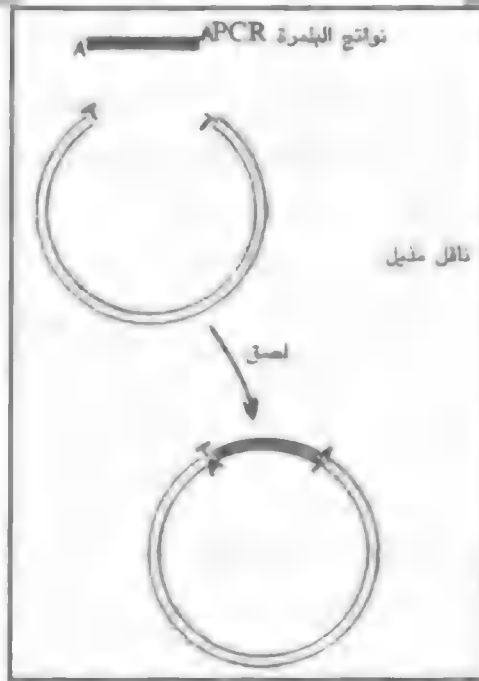
لمعرفة المزيد عن نواتج البلمرة، تُستنسل القطعة في أحد النواقل، ويتم دراستها بإحدى الطرق المعروفة. وقد يبدو هذا سهلاً من الناحية النظرية، ولكن من الناحية العملية أحياناً تتعرّض لعدد من المشاكل مثل نوعية نهايات القطع الناتجة، فقد تنتهي القطع المبكرة عن طريق إجراء البلمرة بنهايات مصمتة يصعب إقحامها في أحد النواقل بهذا الشكل دون توصيلها بأطراف بارزة بالاستعانة بالوصلة (Linker) أو المعشق (Adapter)، إلا أن الأمر ليس بسيطاً أو مباشراً كما قد نتخيله، فالإنزيم *Taq* polymerase يُضيف نيوكليوتيدة إضافية تكون في الغالب الأدينوسين Adenosine لكل طرفي الجديلة المُصنّعة، وهذا يعني أن نواتج البلمرة ثنائية الجديلة ليست مصمتة الأطراف بل كل طرفيه 3' بها نيوكليوتيدة مفردة (شكل 6 - 16).



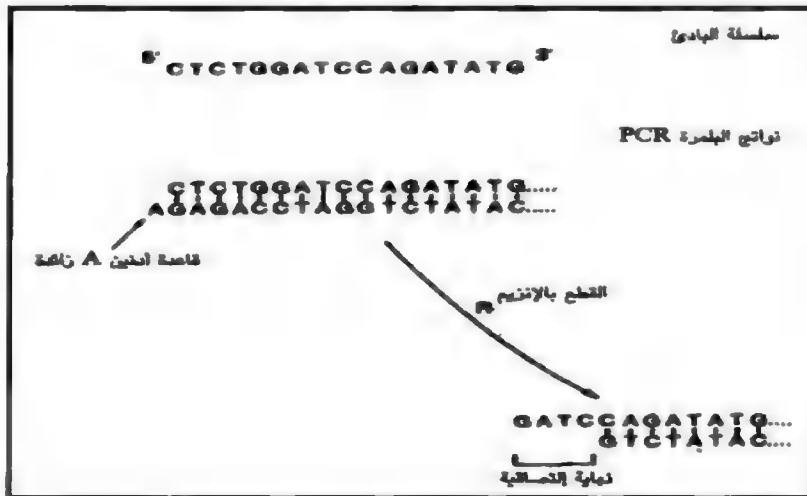
شكل (6 - 16). صناعة السلسلة النيوكليوتيدية (Polynucleotides) عن طريق الإنزيم *Taq polymerase* تحتوي على الأدينوسين Adenosine عند نهاياتها 3' لهذا تتغير أطراف الـ DNA من أطراف مصمتة إلى أطراف بارزة تحتوي على نيوكليوتيدة واحدة تكوّن جسر طرفي من السهل إزالته بالإنزيم Exonuclease.

إن هذا الإجراء غير مستعمل بشكل كبير نظراً لصعوبة التحكم في نشاط الإنزيم وصعوبة إيقافه، مما قد ينتج عنه زيادة تحطيم جزيئات الـ DNA، وعوضاً عن ذلك يستعمل ناقل الاستئصال الذي توجد به قاعدة الثايمين (T) الإضافية، والذي يلتحم في قطعة الـ DNA المكبرة (شكل 6 - 17). وتُحضّر هذه النواقل عادةً بمعاملة الناقل بالإنزيم وقطعه في موقع النهاية المصمتة، ثم معاملته بالإنزيم *Taq polymerase* بوجود سلسلة قصيرة من قواعد الثايمين (dTTP) فقط. ونظراً لعدم وجود البادئ فإن الإنزيم *Polymerase* يقوم بإضافة نيوكليوتيدة الـ T إلى الأطراف 3' من النهايات المصمتة مكوناً بذلك ناقل مذنب بقاعدة الثايمين من السهل أن تُقحم به نواتج البلمرة.

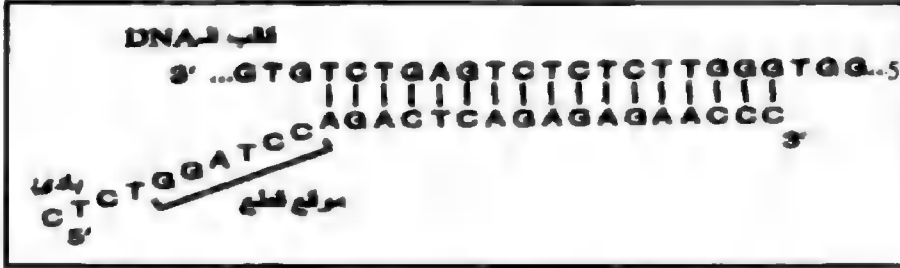
أما الطريقة الثانية وهي المفضلة، فتشمل صناعة بادئين بهما مواقع إنزيمية محدّدة، وبعد إجراء البلمرة تُعامل القطعة الناتجة بالإنزيم *endonuclease* الذي يقطع متوالية البادئ مكوناً بذلك قطع بارزة يمكن أن تلتحم في ناقل الاستئصال الرئيسي (شكل 6 - 18). ويمكن أيضاً إضافة المواقع الإنزيمية إلى سلسلة البادئ عند كل طرفيه 5' (شكل 6 - 19)، وهذه القطع لا تلتحم أو تتجهّج مع جديلة القالب، ولكنها تُستنسَل خلال إجراء البلمرة، وتكوّن نواتج DNA تحمل مواقع إنزيمية طرفية.



(6 - 7). استعمال ناقل T-tailed مذنب بقاعدة الثايمين (T) لاستنسال نواتج البلمرة (PCR)



شكل (6 - 18). الحصول على نواتج PCR مع نهاية التصاقية من خلال استعمال بادئ يحتوي على موقع إنزيمي



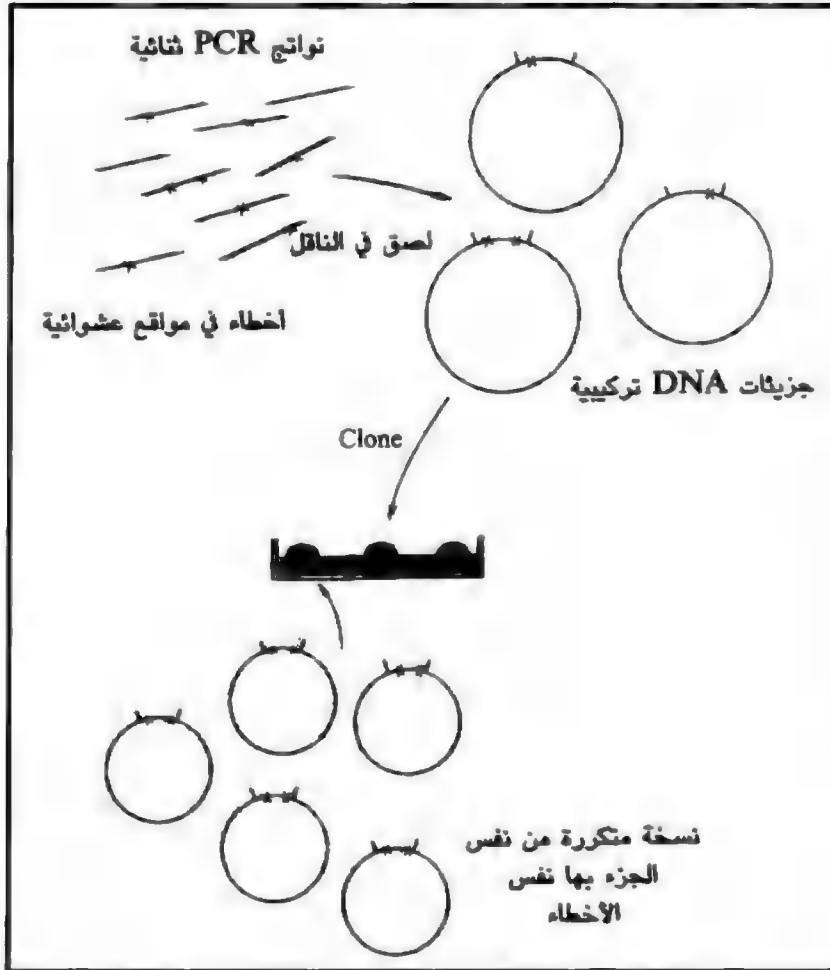
شكل (6 - 19). بادئ PCR له موقع إنزيمي موجود خلال امتداد سلسلة من القواعد في النهاية 5'

أخطاء الإنزيم *Taq polymerase*:

قد تنشأ عن إنزيمات البلمرة Polymerase مجموعة من الأخطاء تتمثل بإضافة نيوكليوتيدة خاطئة في سلسلة DNA النامية، ولكن معظم هذه الإنزيمات يمكنها إصلاح الخطأ بإضافة النيوكليوتيدة الصحيحة بخاصية تُعرف بتصحيح القراءة (Proofreading) التي تعتمد على نشاط الإنزيم Exonuclease من الطرفية 3' إلى الطرفية 5' على امتداد السلسلة. أما الإنزيم *Taq polymerase* فهو لا يمتلك هذه الخاصية، أي أنه غير قادر على تعديل الخطأ، وهذا يعني أن عملية تصنيع DNA لا تُعطي دائماً نسخة صحيحة من DNA، ويقدر معدل الخطأ بإحداث غلطة واحدة في كل 9000 نيوكليوتيدة (ويمكن تجاهله)، والذي يترجم في الواقع إلى خطأ في كل 300 زوج قاعدة، لأنه متكوّن عن البلمرة المتكررة في مجموع 30 دورة، أي أن ظهور الخطأ ناتج عن عملية تراكمية، وبذلك تحتوي القطع المتكوّنة عند إتمام عملية البلمرة على نسخ ناتجة عن خطأ قد تمّ حدوثه خلال إحدى دورات عملية التصنيع.

قد لا تُسبب هذه الأخطاء مشاكل كثيرة خاصة في حالة القراءة المباشرة لنواتج البلمرة، فهو غالباً يقدّم التسلسل الصحيح لقالب DNA حتى لو احتوت نواتج الـ PCR على أخطاء ناتجة عن الإنزيم *Taq polymerase*، لأن الأخطاء موزعة عشوائياً، وكل قطعة مكبرة لها خطأ في نيوكليوتيدة محدّدة، وتتكوّن العديد من الجزيئات التي تحمل المتواليات الصحيحة مما يُقلّل من أهمية هذا الخطأ.

أما في حالة استنسال نواتج البلمرة في ناقل معين، فهذا أمر غير مُتَوَقَّع، لأن كل ناقل يحتوي على نسخ عديدة من قطعة مكبرة واحدة ناتجة عن الـ DNA المستنسل على متوالية الجزيء الأصلي نفسها والمستعمل في البلمرة (شكل 6 - 20). وهذا قد يحدث مع جميع التجارب التي تحتوي على إجراء استنسال نواتج البلمرة، لذلك يفضل دراسة نواتج البلمرة مباشرة دون أن تُستنسل في ناقل.



شكل (6 - 20). معدل الخطأ العالي لإنزيم *Taq polymerase* يُصبح عاملاً مهماً عندما تُستنسل نواتج الـ PCR

تطبيقات تفاعل الـ PCR:

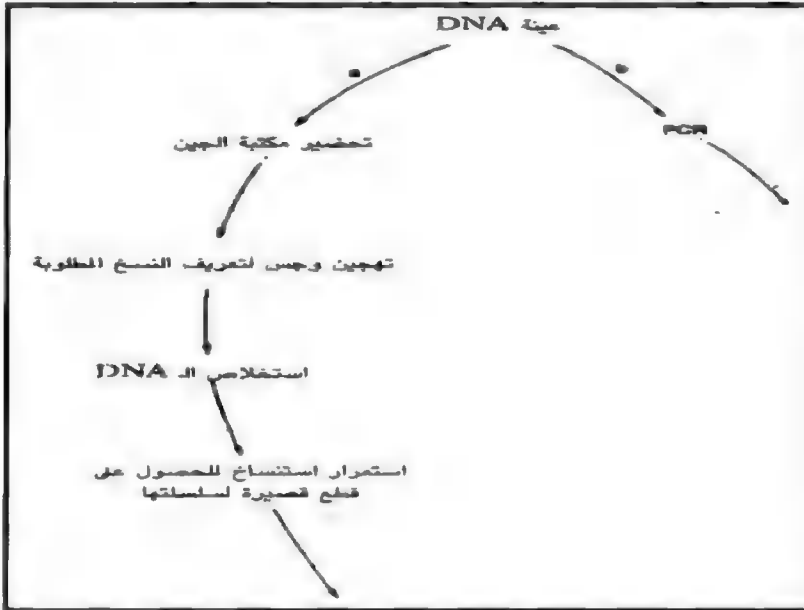
قد يبدو مما سبق أن تفاعل البلمرة هو عبارة عن تكبير قطعة من الـ DNA اعتماداً على معرفة السلاسل النيوكليوتيدية لأطراف هذه القطعة، مما سهّل عملية تحليل بعض مناطق الـ DNA التي لم تُدرس من قبل بالطرق المعتادة. فإذا كان الأمر كذلك فلماذا أصبح هذا الإجراء من الأمور المهمة في مجالي البيولوجيا الجزيئية والتقنيات الحيوية؟ الإجابة عن هذا السؤال قد نستشفها من عرض الأسباب التي نتناولها في الفقرات الآتية:

استعمال الـ PCR في دراسة كمية قليلة من الـ DNA:

لتقنية الـ PCR مقدرة فائقة في إكثار جزء صغير من الـ DNA مثل تكبير DNA الحيوان المنوي الذي يحتوي فقط على نسخة مفردة من الجينوم البشري. وقد أدت هذه الدقة إلى إمكانية تطبيق التحاليل البيولوجية الجزيئية على عينات قليلة من الـ DNA قد لا تكفي لإجراء الاستئصال العادي، كما برهنت أيضاً على أهميتها في مجال الطب الشرعي، وخاصةً فيما يُعرف بالبصمة الوراثية من مصادر بيولوجية صغيرة مثل الشعرة أو بقايا بقعة دم في موقع الجريمة، مما ضيق الخناق أمام المجرمين وصعوبة هروبهم من قبضة القانون والعدالة. وقد استعمل هذا الإجراء في تكبير عينات الـ DNA من عظام الأموات والتعرّف على الضحايا، مثلما تمّ في محاولة التعرّف على عظام نيكولاس الثاني Nicholas II آخر قيصرية روسيا والذي دُفن سنة 1917 في مكانٍ ما في مدينة أكرنبرج Ekaterinburg. كما فتحت قدرة وحساسية هذا الإجراء آفاقاً جديدة في علم الآثار والحفريات Palaeontology، إذ أصبح بالإمكان الحصول على سلاسل نيوكليوتيدية قصيرة من DNA بقايا مواد محتّنة أو مُجمّدة، أو دراسة صلة القرابة والعلاقات الوراثية بين المجتمعات البشرية وبين الشعوب القديمة من خلال دراسة بقايا الـ DNA الموجودة في مخلفات عظامهم أو محفوظة منذ زمن بعيد مثل مومياء الفراعنة المحتّنة أو حتى الجثث الغارقة والمتحلّلة، كما استعمل في حل طلاسم أصول الأمريكيين الأوائل ومسالك المهاجرين الين استعمروا الباسفيك، وفي قياس الزمن الجيولوجي لبقايا النباتات، ودراسة الحشرات المدفونة في صمغ النبات أو في صمغ الكهرمان منذ قرون بعيدة.

الPCR والتشخيص الطبي:

لقد استعمل إجراء الـ RFLP في الكشف عن الطفرات الجينية البشرية التي قد تؤدي إلى تكوين الأمراض الوراثية اعتماداً على الطفرة أو تغيير موقع الإنزيم على متواليات الـ DNA، وما يترتب على ذلك من تغير في طول القطعة التي يقع عليها الإنزيم. لكن هناك الكثير من الطفرات الممرضة لا ينتج عنها نمط RFLP إلا إذا قرأت السلسلة النيوكليوتيدية للمناطق الجينومية، الأمر الذي يتطلب تحضير المكتبة الجينومية لكل مريض واستخلاص النسخة التي تحتوي على الجين الكامل للطفرة (شكل 6 - 21 - a). وفضلاً عن صعوبة تطبيق هذا الإجراء، فهو أيضاً مستهلك للوقت، لذلك يستعمل إجراء البلمرة بدلاً عنه، لأنه يقدم معلومات وفيرة وبشكل أسرع بكثير عن المنطقة المستهدفة من الجينوم وتحليلها مباشرة (شكل 6 - 21 - b). هذه الخطوة مهمة ليس في سرعة رصد الطفرات والتشخيص الطبي فقط، وإنما في بحوث الأمراض الوراثية التي تعتمد على فحص المجموعات والأفراد المعرضين لخطر الطفرات المحتملة.

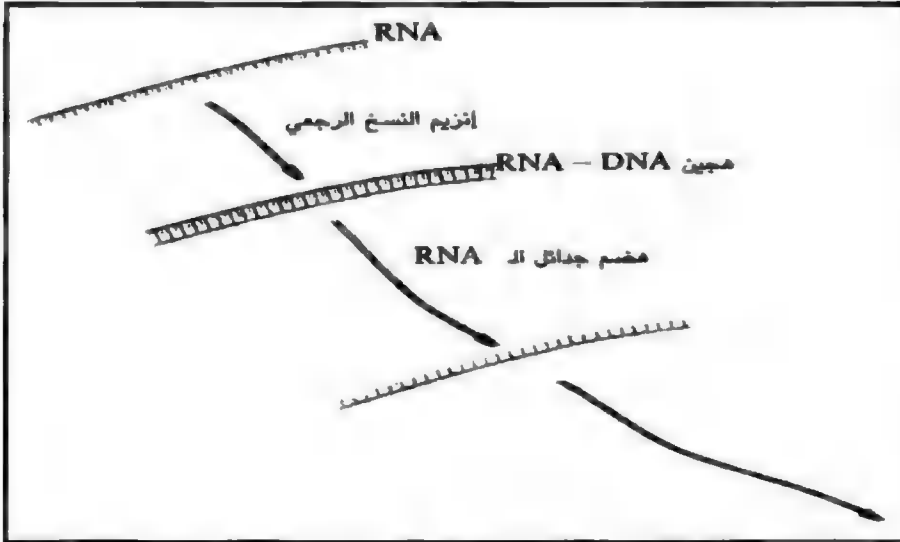


شكل (6 - 21). مقارنة بين (a) الطريقة العادية و (b) طريقة الـ PCR في الحصول على متواليات الجين من DNA الإنسان

ولقد أمكن عن طريق استعمال الـ PCR تشخيص المسببات المرضية قبل أن تظهر أعراضها بأسابيع أو شهور، كما يمكن أيضاً الاعتماد على الخاصية نفسها في العلاج المبكر للفيروسات المسببة للأمراض السرطانية مثل سرطان عنق الرحم الناتج عن الفيروس *Papillomaviruses*.

استعمال الـ PCR لتكبير الـ RNA:

لا يقتصر إجراء البلمرة على تكبير قوالب الـ DNA فقط، بل يمكن أيضاً تكبير جزيئات الـ RNA التي تحوّل إلى سلاسل مفردة من الـ DNA باستعمال إنزيم النسخ العكسي Reverse transcriptase (شكل 6 - 22). ويتمثل استعمال إجراء RT-PCR في قياس كميات الـ mRNA في الأنسجة المختلفة أو في النسيج نفسه وفي أوقات زمنية متفاوتة (شكل 6 - 23). ونظراً لأن كمية الـ mRNA في الخلية تمثل مقدار نشاط الجين، لهذا يمكن قياس هذا النشاط كميّاً عن طريق تهجين نورثرن Northern hybridization لقياس الكميات الكبيرة فقط، ولكن إجراء البلمرة يمكن أيضاً أن يقيس الكميات القليلة وخاصة للجينات الضعيفة.



شكل (6 - 22). النسخ العكسي للـ mRNA وإكثاره بطريقة RT-PCR

تم إجراء البلمرة PCR باستعمال عينات تحتوي على كميات متساوية من الـ RNA ولكن كميات الـ DNA كانت متزايدة وتحتوي على الجين الذي ينسخ منه الـ mRNA، والقطعة المستهدفة بالبلمرة تشمل أنترون يقع داخل الجين، ولهذا تكون نواتج البلمرة من الـ DNA ناشئة عن الـ mRNA، وتظهر الحزم التكونية عن عينات الـ RNA والـ DNA في المجال رقم 2 على الهلام بالكثافة نفسها إشارة إلى أن نواتج البلمرة تحتوي على عدد متساوي تقريباً من نسخ المتواليات المستهدفة بالدراسة في كل من الـ DNA والـ mRNA.

عند استعمال بادئين قصيرين جداً ينتج عنهما مزيج من القطع المختلفة، وهذا أمر غير مرغوب فيه بصورة عامة، ولكن يُفيد في دراسة التواريخ العرقية (Phylogenetics) الذي يكشف عن تاريخ التطور (Evolution)، وتحديد نسب الأنواع الحية إلى بعضها متمثلاً في نمط حزم نواتج البلمرة باستعمال البادئ العشوائي والترحيل الكهربائي الذي يعكس تركيب جزيء الـ DNA المستعمل كقالب، فإذا استعمل DNA الخلية الكامل كمادة أولية، فإن نمط الحزم الناتجة يمثل انتظام جينوم الخلية، وبهذا يمكن قياس الاختلافات بين جينومات كائنين سواء من النوع نفسه أو نوعين مختلفين باستعمال بادئين عشوائيين (Random primers) ويتوقع أن ينتج كائنان

لها صلة وطيدة ببعضها نمطاً من الحزم المتشابهة أكثر من الكائنات بعيدة الصلة من حيث المنشأ في مفهوم التطور، ويُطلق على هذا الإجراء (Random amplified polymorphic DNA) ويُختصر RAPD. وكما هو الحال في دراسات التواريخ العرقية Phyolygen يُعدّ تفسير نتائج RAPD من الأمور المعقّدة ولا يوجد حتى الآن اتفاق على الطريقة المثلى لتحليل النتائج.

وقد تمت محاولات عديدة اعتمدت على هذه الطريقة، مثل دراسة الأجسام الثمرية للفطر أرميلاريا بلبوس *Armillaria bulbose* التي تمّ تجميعها من مساحة جغرافية كبيرة في شمال ولاية ميشيغان الأمريكية. وقد أظهرت نتائج RAPD أن لها جينومات متشابهة، ولا تُظهر أي اختلافات داخل النوع الواحد، لأن الموقع يحتوي على نسخة واحدة من الفطر، وربما يكون هو أحد أقدم الكائنات الذي حافظ على تركيبته الوراثية على الكرة الأرضية منذ أقدم العصور.

التهجين الجزيئي:

يمثل تهجين الأحماض النووية أحد الإجراءات الأساسية في تكنولوجيا الجين لإنتاج الـ DNA التكميلي (cDNA) أو المكتبة الجينومية الوراثية باستعمال المجس Probe الذي يستكشف المكاتب الجينومية والتعرف على تسلسلاتها.

مجسات الحامض النووي (Nucleic acid probes):

تعتمد قوة التهجين على التحام التسلسلات التكميلية (Complementary sequences) مع بعضها بناءً على درجة التجانس بين تسلسلات التهجين.

ويُصنع المجس من سلسلة من القواعد تتكامل مع سلسلة أخرى في الجين الموجود في الـ DNA المستهدف للدراسة، وقد يستعمل المجس المُعد من أحد الكائنات في الكشف عن نسخ الجين نفسه من كائنات أخرى، لذلك استعملت هذه المجسات في تعريف عدد كبير من الجينات المُشابهة من مصادر مختلفة، وهي على ثلاثة أنواع:

(1) مجس الـ DNA المُكَمَّل (cDNA).

(2) مجس الـ DNA الجينومي.

(3) مجس السلسلة النيوكليوتيدية القصيرة (Oligo nucleotide).

تعتمد صناعة المجس على معرفة تسلسل الجين المستهدف، فقد تستعمل نسخة من الـ cDNA كمجس لاستكشاف المكتبة الجينومية مباشرة، وقد يصنع الـ cDNA من الـ mRNA الذي يستعمل غالباً فيما يُعرف بطريقة الكشف الموجب والسالب plus / minus التي نلجأ إليها عند صعوبة تعبير الجين، لهذا تصنع المجسات من mRNA الخلايا التي تُعبر عن الجين، وهذا ما يُعرف بالمجس الموجب، أو من الخلايا التي لا تُعبر في الجين وهذا ما يُعرف بالمجس السالب.

تتكوّن مجسات الـ DNA الجينومي من تسلسلات مُستسلة تستعمل كمجسات غير متشابهة لجس محتويات الجين المُستهدف.

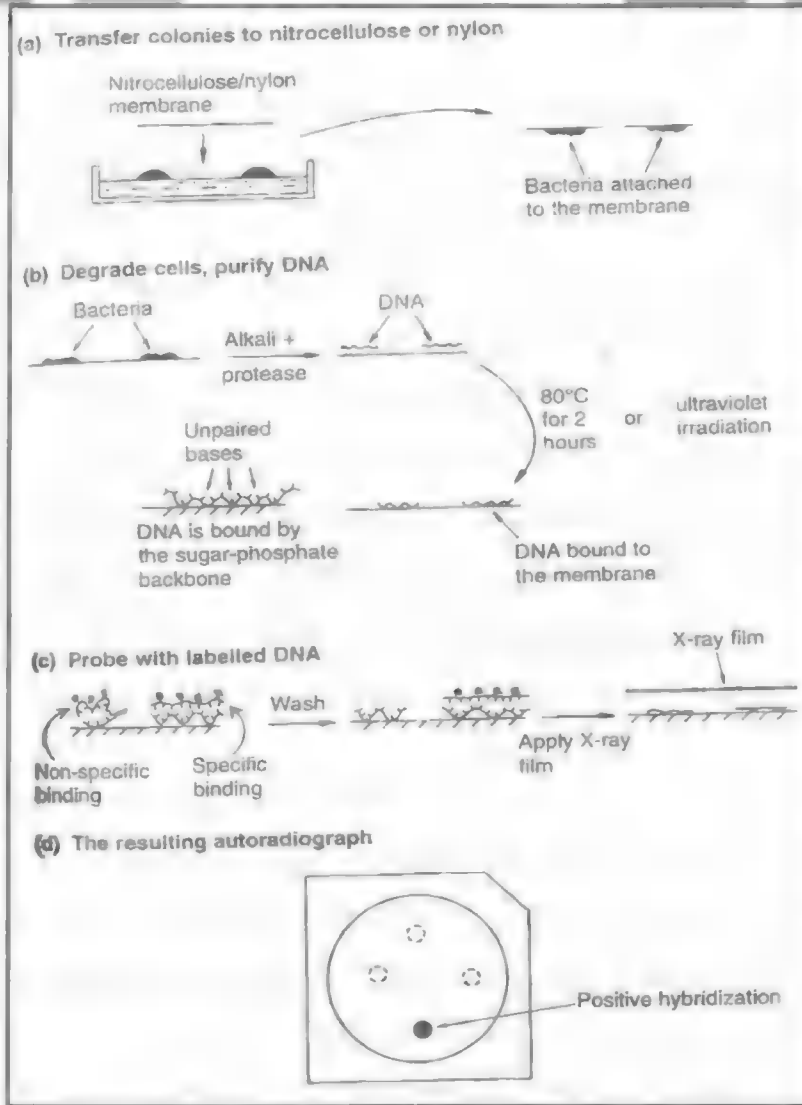
وهذه الإجراءات يُطلق عليها المني على الكروموسوم (Chromosome walking) أو القفز على الكروموسوم (Chromosome jumping)، وهي إجراءات يمكن عن طريقها تعريف التسلسلات القصيرة المتداخلة التي تُضم فيما بعد إلى بعضها لإنشاء القطع الطويلة من الـ DNA وتوصيفها.

تستعمل السلاسل النيوكليوتيدية القصيرة بناءً على توفر المعلومات المتعلقة بتسلسل الحامض الأميني للبروتين الذي يُنتجه الجين المُستهدف. ونظراً لأن الطبيعة الإنحلالية للشفرة الوراثية تعني عدم توقع شكل التسلسل المتكوّن عن هذا البروتين، وللتغلب على ذلك يستعمل مزيج من المجسات التي تطابق جميع التسلسلات المتوقعة، والميزة هنا أن هذه المجسات تحتاج فقط إلى أجزاء صغيرة من التسلسل المطلوب حتى ترتبط به، وفي حال الحصول على المجس المناسب يوسم بالفسفور المشع P^{32} للكشف عن الجين المُستهدف.

فحص بنوك الاستنسال:

إن الاعتماد على الحالات (مناطق التحلل) الفيروسية أو المستعمرات البكتيرية قد لا يفي في بعض الأحيان كوسيلة للكشف المباشر، لذلك تستعمل طريقة الطبع على أغشية النيتروسيليلوز أو النايلون (أغشية التهجين) أو ما يُسمى بالتهجين الجزيئي، إذ تُنمى الخلايا على طبق أجار ثم يوضع غشاء التهجين على سطح طبق الأجار لتلتصق المستعمرات النامية على الطبق، وتكون مثل صورة على مرآة، ثم تعالج الأغشية لإظهار الـ DNA وإزالة مخلفات الخلايا.

يُضاف المجس المعلم إلى الغشاء في كيس بلاستيك (حقبة التهجين) يحتوي على دارئ التهجين، ويُحضن عند درجة حرارة مناسبة بحيث توضع حقبة التهجين في جهاز هزاز (يهتز بهدوء) لإتاحة ارتباط المجس مع التسلسل المُشابه له في الـ DNA. وبعد ذلك يتم إخراج الأغشية وغسلها وتجفيفها، ومن ثم تُعرّض لفلم أشعة سينية للحصول على الصورة الإشعاعية الذاتية التي يمكن مقارنتها مع الطبق الأصلي لتعريف المستعمرة المحتوية على الـ DNA المُستنسل (Recombinants) (شكل 6 - 24).



شكل (6 - 24). التهجين الجزيئي للمستعمرات

(Colony hybridization)

(a) نقل المستعمرات على غشاء التهجين. (b) تحليل الخلايا وتنقية الـ DNA.

(c) إضافة المجس المعلم. (d) نتيجة الصورة الإشعاعية الذاتية.

الكشف المناعي:

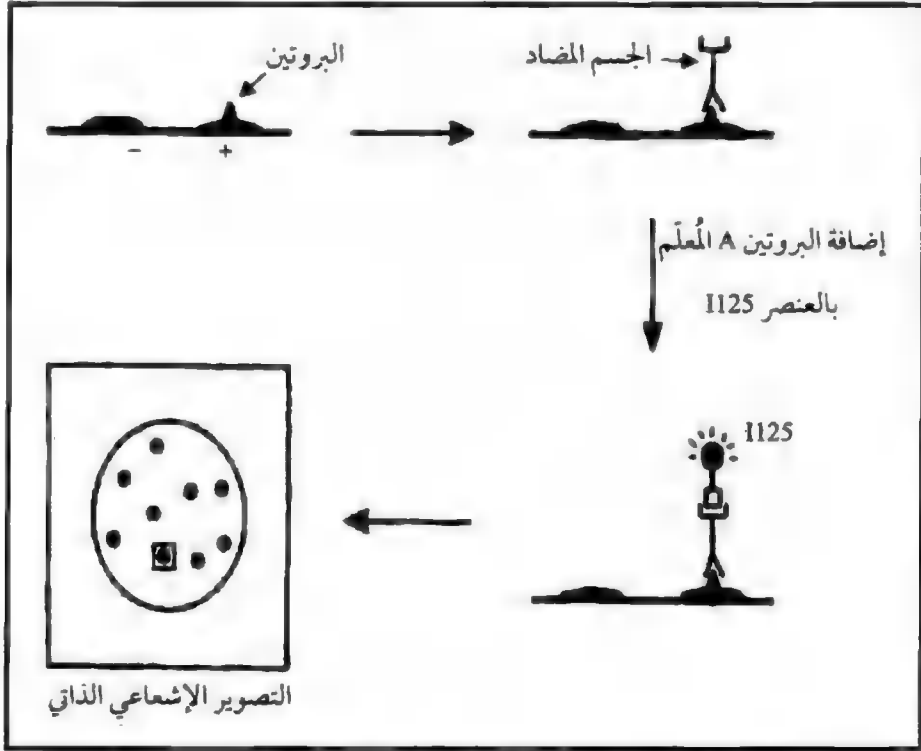
إن الإجراء البديل عن الكشف بالمجسات للتعرف على جين معين في المستعمرة هو التعرف على الناتج البروتيني لذلك الجين بالطرق المناعية، وذلك باستعمال جسم مضاد (Antibody) معين يرتبط مع ناتج الجين (البروتين) بدلاً من مجس الـ DNA.

يوجد نوعان مهمان من تحضيرات الأجسام المضادة، وهي:

1. الأجسام المضادة متعددة النسيلة (Polyclonal antibodies)، والتي تحضر من خلال حقن الأرانب بالمستضد (Antigen) ثم سحب عينة من الدم بعد حدوث الاستجابة المناعية بحيث تُنقى جزيئات بروتين الجلوبيولين المناعي (Immunoglobulin) من المصل ثم يستعمل كمستحضر أجسام مضادة، وهي التي يُطلق عليها المصل المضاد (Antiserum) التي تتميز بالمراكز المستضدية.

2. الأجسام المضادة أحادية النسيلة (Monoclonal antibodies)، وهي أكثر تخصصاً، إذ تتميز بمراكز مستضدية مفردة. ونظراً لأن إنتاج هذه الأجسام المضادة يحتاج إلى تقنية معقدة، لهذا تستعمل طرق أخرى مشابهة لطريقة نقل الحالات مع وجود مجسات الـ DNA.

لدينا في المثال أدناه (شكل 6 - 25) خلايا متحوّلة بالفاج λ gt11 و cDNA تعتبر عن الإنزيم β -galactosidase. يتم التقاط البروتين (الإنزيم) على غشاء التهجين، ثم يرتبط به الجسم المضاد، ويكشف عنه باستعمال جزيء التحام ثانوي غير متخصص مثل بروتين A المُستخلص من البكتريا أو جسم مضاد ثانوي يرتبط بالجسم المضاد الأولي المخصص لهذه الغاية. وعادةً ما يتم الاستدلال على نجاح الكشف بالتوسيم الإشعاعي للبروتين باليود المشع I^{125} أو باستعمال طرق غير إشعاعية تنتج مواد ملونة.



شكل (6 - 25). الفحص المناعي لتعبير الجينات

يؤخذ الغشاء من الطبق الذي يحتوي على التركيبات المتكونة من cDNA والناقل لأمدا. يلتصق البروتين وبقايا الخلية مع المرشح. تظهر حالات البروتين المستهدف (+) الذي يصعب تمييزه عن بقية البروتين (-). يُحضن المرشح مع الجسم المضاد الأول والمتخصص بالبروتين المستهدف الذي يرتبط مع البروتين A الموسوم بالعنصر المشع، ثم يؤخذ التصوير الإشعاعي الذاتي.

عند استعمال حامض أميني مُشع مثل methionine [^{35}S] في مخلوط الترجمة فسوف يوسم البروتين المُصنَّع من mRNA ويمكن اكتشافه بالتصوير الإشعاعي أو الفلوري من خلال الترحيل الكهربائي هلام متعدد الأكريل أمايد (SDS-polyacrylamide).

وبناءً على ذلك تظهر في الصورة عند استعمال طريقة قبض الترجمة HART (Hybrid arrest translation) كل الحزم ما عدا واحدة. أما في طريقة تحرير الترجمة

HRT (Hybrid release translation) فستظهر حزمة واحدة وتحتفي بقية الحزم، ومن هذا يتضح أن تهجين تحرير الترجمة يُعطي نتيجة أوضح من التهجين القابض للترجمة.

خرائط التقطيع الإنزيمي:

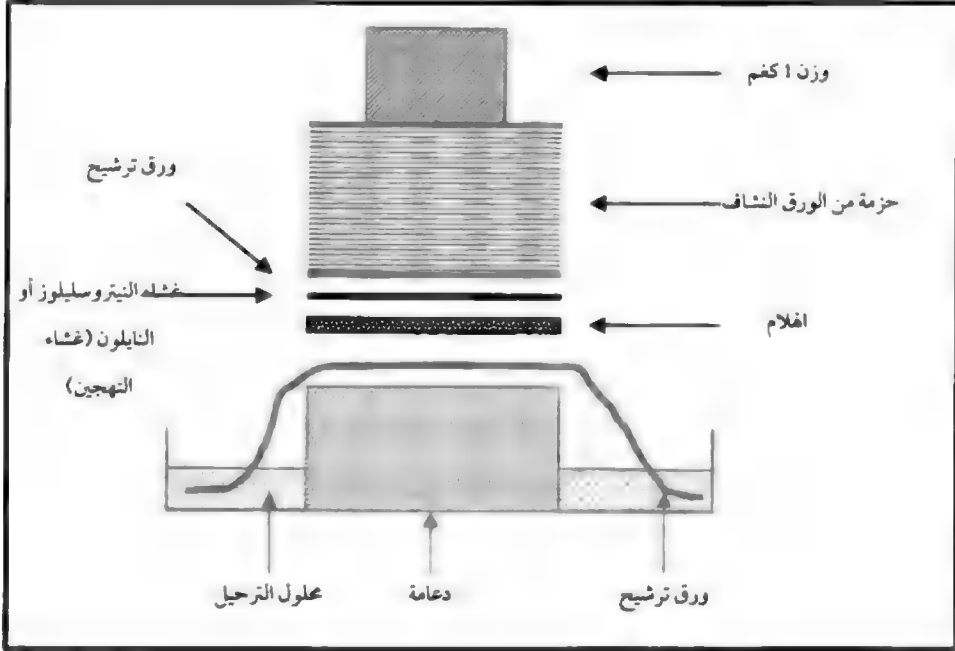
إن الحصول على الخريطة الإنزيمية لقطعة DNA المستهدفة بالدراسة يُعدّ أمراً ضرورياً قبل الدخول في أية تجربة، لأن الخريطة الإنزيمية توفر قطعاً صغيرة من DNA يسهل استعمالها في إجراءات عدّة بما في ذلك الاستئصال أو تحضير مجسات المشي على الكروموسوم (Chromosome walking) ودراسة تسلسل DNA، إذ يُقطع DNA بعدّة إنزيمات لتحديد عدد القطع الناتجة عن كل إنزيم. ويتم اختيار الإنزيم الذي يقطع DNA من 2 - 4 قطع بإجراء سلسلة من الهضم المفرد والمتعدد، ومن ثمّ يمكن ضم الخريطة الإنزيمية الكاملة إلى بعضها واستنباط المعلومات اللازمة لتوصيف القطعة الكاملة.

تقنيات وصمة التهجين (Blotting techniques):

قد لا تكفي الخريطة الإنزيمية وحدها للإحاطة بالمعلومات المطلوبة عن القطعة المُستنسلة ومعرفة الجينات التي تحتويها، إذ إن هدفنا في النهاية هو الحصول على تسلسل الجين وما يتعلّق به من معلومات، فمثلاً لا نستطيع أن نبدأ مباشرة بدراسة التسلسل لقطعة طولها 20 كيلو قاعدة من DNA في الناقل لامتداد الاستبدالي لتتعرّف على تسلسل صغير لجين طوله 2 كيلو قاعدة فقط يقع داخل هذه القطعة، لأن ذلك يُعدّ مضيعةً للوقت والجهد، لذا ابتكرت طريقة وصمة تهجين جزيئات الحامض النووي على الأغشية وتهجينها مع مجسات خاصة. ويمكن أن يُطبّق هذا الإجراء أيضاً على المستعمرة البكتيرية أو الفاجية.

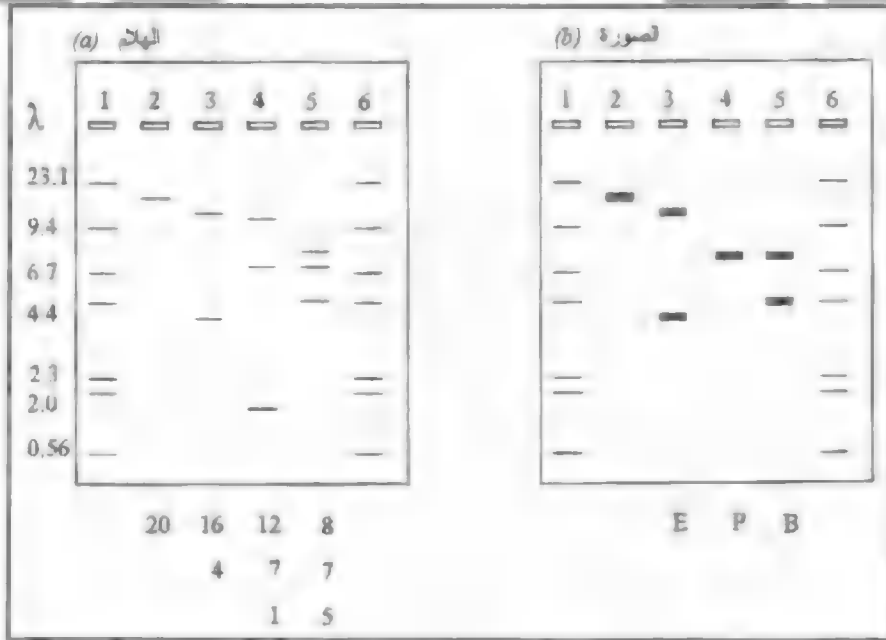
إن أول من طوّر هذه التقنية هو إد سوزرن Ed Southern وبذلك تُسببت إليه هذه التقنية وسُمّيت بوصمة سوزرن (Southern blotting)، وتشمل تعريض قطع DNA المُنتجة من الهضم الإنزيمي إلى الترحيل الكهربائي في هلام الأجاروز، ثمّ

تُنقل القطع المنفصلة إلى غشاء النيتروسليلوز أو النايلون بإجراء التشريب بالخاصية الشعرية كما هو مبين في الشكل (6 - 26).



شكل (6 - 26). جهاز الوصمة (Blotting apparatus)

يوضع الافلام على ورق ترشيح، ثم يوضع عليه غشاء النيتروسليلوز أو النايلون، ثم توضع عليه طبقات أخرى من ورق النشاف، إذ يمر المحلول المنظم خلال الافلام عن طريق الخاصية الشعرية، ومن ثم تُنقل أجزاء الحامض النووي من الافلام لتُطبع على غشاء التهجين. عندما تشرب القطع وتُطبع على الغشاء تكون صورة مُكررة ثم يُهجن الغشاء مع مجس إشعاعي بطريقة تهجين المستعمرات نفسها أو الحالات الفيروسية، وبعد التهجين يُغسل الغشاء ويُعرض إلى فلم أشعة سينية للتصوير الإشعاعي الذي يُبرز المعلومات المُتعلقة بالنسيلة (Clone) المُستهدفة (شكل 6 - 27).



شكل (6 - 27). وصمة سوفرن

نستعمل في هذا المثال قطعة DNA افتراضية حجمها 20 كيلو قاعدة من نسخة الجينوم ونسخة من mRNA كمجس:

(a) نمط القطع المتكونة نتيجة المعاملة بإنزيمات مختلفة.

(b) صورة تصوير إشعاع ذاتي ناتجة عن التهجين.

المجالان 1 و 6 يحتويان على DNA لامدا القياسي المقطوع بالإنزيم *HindIII* مع الحزم الناتجة معلمة على الصورة للرجوع إليها، أما القطع السليمة في المجال 2 تُطبع كحزم تُهجن مع المجس، والأعمدة 3 و 4 و 5 توضح المعاملات الإنزيمية *EcoRI* (E) و *PstI* (P) و *BamHI* (B) وحجوم القطع مدونة تحت كل عمود في (a) وتُبين نتيجة الصورة تهجين المجس مع حزمتين في حالة المعاملة بالإنزيم *EcoRI* و *BamHI* لهذا يُفترض أن يكون للقطعة موقعان داخليان لتأثير الإنزيمين. أما المعاملة بالإنزيم *PstI* فيبين التهجين مع قطعة واحدة فقط حجمها 7 كيلو قاعدة، وهذه القطعة مرشحة لإجراء عملية الاستئصال الثانوي، وقد يقع الجين بالكامل فيها.

فضلاً عن بساطة فكرة تقنية الوصمة، فهي تُعدّ أيضاً طريقة سهلة وكافية لتحليل الجين، ويمكن استعمالها مع الـRNA، ونظراً لأنها عكس الـDNA، لذلك أطلق عليها وصمة نوذرن (Northern blotting) التي تستعمل في تحديد نمط التهجين الجزيئي لعينات الـmRNA، كما يمكن أن تستعمل لتحديد مناطق الـDNA التي تنهجن مع الـmRNA.

هناك أيضاً إجراءان آخران في موضوع الوصمة، وهما:

1. لا تتعرض فيه عينات الحامض النووي إلى الترحيل الكهربائي، بل توزّع كبقع على الأغشية، وتُهجن سواءً بوصمة Southern أو Northern، ولهذا يُعرف الإجراء بوصمة البقعة (Dot-blotting)، وهو إجراء مفيد ومعروف للحصول على المعلومات الهامة لدراسة التعبير الجيني.

2. يُعرف بوصمة ويسترن (Western blotting) ويشمل نقل جزيئات البروتين بالترحيل الكهربائي إلى الأغشية، ومن ثم يُجس الغشاء بجسم مضاد لاكتشاف البروتين المُستهدف بطريقة الكشف المناعي للهالات الفيروسية المُتقاة نفسها عند دراسة تعبير جينات المكتبة الجينومية.

دراسة تسلسل الـDNA (DNA sequencing):

لقد أصبح هذا الموضوع الآن إجراءً عادياً لآية عملية استسار في معظم المختبرات، إذ إن دراسة تسلسل الـDNA يقدم معلومات كثيرة ومفيدة عن الجينات ومناطق التحكم بها، وإبراز المظاهر الأخرى مثل التسلسلات البينية (Intervening sequences) وغيرها، ولهذا فإن الوصف الكامل الذي يشمل تحليل التسلسل يُعدّ الآن أمراً مهماً وضرورياً.

تعتمد خطة قراءة التسلسل أو تحليله على عدد من العوامل منها: طول القطعة المُستهدفة بالدراسة، فمثلاً عند دراسة سلسلة طولها يتراوح من 300 إلى 400 كيلو قاعدة، نحتاج إلى معاملات عديدة ومختلفة، أما إذا كان الـDNA يتكوّن من عدّة مئات من القواعد الشائبة فقد يُدرس في خطوة واحدة فقط.

وهناك طريقتان أساسيتان لقراءة التسلسل هما: الطريقة العشوائية والتي يُطلق عليها الطلقة (Shootgun)، والطريقة المجهزة (Ordered sequencing) التي يتم فيها معرفة موقع كل قطعة معرفة تامة قبل إجراء دراسة التسلسل. ففي طريقة الطلقة يتم إنتاج ودراسة القطع بصورة عشوائية، ثم يدرس التسلسل الكامل عن طريق علاقة التداخل بين التسلسلات المختلفة بالحاسب الآلي.

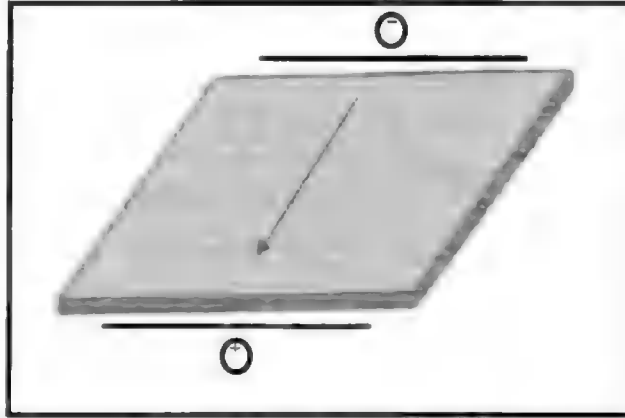
ومن الواضح أن الطريقة المجهزة أجدى بكثير من طريقة القطع العشوائية، فضلاً عن أن هناك طرقاً عديدة لإنتاج قطع محددة مثل إنتاج سلسلة من النسائل الثانوية (Sub-clones) التي يُلقى أو يُحذف منها التسلسل المُستهدف عن طريق الإنزيمات القاطعة، ولكن يبقى فوق كل ذلك ضرورة توفير خريطة إنزيمية كاملة للنسخة الأصلية بحيث يمكن تعيين القطع المناسبة، ومن ثم يُجرى لها استنساخ ثانوي في ناقل مُعد خصيصاً لهذه الدراسة مثل الناقل pBluescript أو M13، ويُدرس تسلسل كل نسيلة ثانوية لوحدها باتباع طريقة Dideoxy إذ يُقرأ شريطا الـ DNA كل على حدة لكي يتم اكتشاف أي شذوذ، ومن ثم القراءة عن طريق الحاسب الآلي.

إن إستراتيجية اختيار الطريقة الملائمة مهمة في إعطاء المعلومات الدقيقة عن القطع المكلونة، لذلك أصبحت دراسة قطع الـ DNA من الخطوات المهمة جداً في تقنيات الجين.

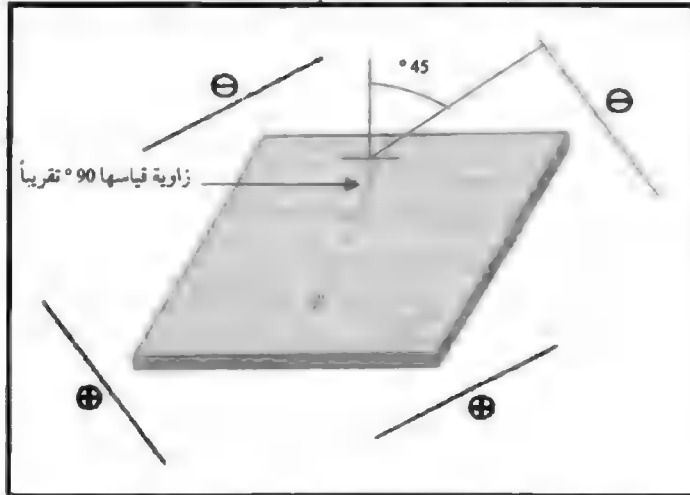
فصل الكروموسومات بالترحيل الكهربائي:

إن أول ما يتم التفكير به لتحديد موقع الجين المطلوب هو معرفة الكروموسوم الذي يقع عليه هذا الجين. ويتم ذلك بنوع خاص من تهجين سوذرن دون اللجوء للخريطة الإنزيمية. وباستعمال كروموسومات سليمة يتم عزلها بإجراء ترحيل كهربائي خاص. ففي الترحيل الكهربائي العادي يُمرّر التيار الكهربائي خلال الهلام وتُرحّل جزيئات الـ DNA في خط مستقيم باتجاه القطب الموجب (شكل 6 - 28) بحيث يمكن فصل الأحجام المختلفة بناءً على المسافات التي ترحّلها خلال الهلام. ولكن هذا الإجراء لا يصلح إلا للأحجام الجزيئية الصغيرة وليس للأحجام الكبيرة وخصوصاً التي يفوق حجمها الجزيئي 50 Kbp والتي يستعمل لها حقل كهربائي خاص مصمم يُطلق عليه الترحيل الكهربائي الهلامي متناوب الحقل المتعامد OFAGE

(Orthogonal Field Alteration Gel Electrophoresis)، إذ يتناوب التيار بين زوجين من الأقطاب، كل زوج يصنع زاوية مقدارها 45° وينتج عن ذلك تيار نبضي تتحرك بموجبه الجزيئات في حركة نبضية وتغير اتجاهها بناءً على اتجاه التيار، بحيث يتناوب الحقلان بطريقة منتظمة، ويترتب عليه حركة الـ DNA في الهلام تبدأ من أحد الأطراف إلى الطرف الآخر في خط مستقيم إلى حد ما، ولكن مع كل تغير في اتجاه الحقل الكهربائي يمر كل جزيء بزاوية 90° قبل أن يستأنف ترحيله (شكل 6 - 29).



شكل (6 - 28). هُلام الأجاروز المعتاد



شكل (6 - 29). الترحيل الكهربائي بطريقة OFAGE

وتُعَدّ هذه الخطوة الركيزة في هذا الإجراء، وفيها يُعدّل الجزيء القصير اتجاهه أسرع من الجزيء الطويل، ومن ثمّ يتقدّم الجزيء القصير باتجاه نهاية الهلام بسرعة أكثر، وتتكوّن مسافات واضحة، بحيث يمكن فصل الجزيئات الكبيرة مثل كروموسومات الخمائر والفطريات الخيطية والأوليات (Protozoa) مثل طفيلي الملاريا (*Plasmodium falciparum*).

وتُعَدّ تقنية الـ OFAGE والطرق الشبيهة الأخرى مثل إجراء الحقول الكهربائية الكنتورية المتشابهة CHEF (Contour clamped homogeneous electric field) و FIGE (Field invasion gel electrophoresis) من الإجراءات المهمة للأسباب الآتية:

1. يمكن تنقية DNA الكروموسوم من الهلام وعمل سلسلة من المكتبات الجينية. وكل مكتبة من هذه المكتبات تحتوي على الجينات المثلثة لكروموسوم واحد، وتكون بلا شك صغيرة وسهلة التداول مقارنةً بالمكتبة الجينومية الكاملة.

2. يمكن نقل جزيئات الـ DNA الكروموسومي إلى غشاء التهجين عن طريق نقل سودرن (Southern transfer) وإجراء التهجين (Hybridization analysis) للتعرف على الكروموسوم الذي يحمل الجين.

التباين في أطوال قطع التقييد RFLP

Restriction fragment length polymorphism

الـ RFLP (ويُلفظ رفلب Rif-lip) هو التباين في تسلسل DNA الجينوم، والذي يُمكن تحديده من خلال تقطيع الـ DNA إلى أجزاء بالإنزيمات القاطعة، وتحليل حجم القطع بواسطة الترحيل الكهربائي.

إن دراسة التباير في الـ RFLP تُعدّ وسيلة مهمة في رسم الخرائط الجينومية، ومعرفة مواقع جينات الأمراض الوراثية، وتحديد خطورة المرض، وإجراء البصمة الوراثية، واختبارات الأبوة، والحالات الجنائية، من خلال تحديد مصدر عينة الـ DNA، فضلاً عن ذلك يستعمل RFLP في تحديد الحالة المرضية للفرد وتوصيف التبايرات الوراثية وأنماط التربية في المجاميع الحيوانية، وفي قياس معدلات إعادة التشكيل

(Recombination)، والتي يمكن أن تُقضي إلى رسم الخرائط الوراثية والمسافة الوراثية بين مواقع RFLP (Loci) محسوبة بالسنتيمورجان (CentiMorgan)، ويُستعمل أيضاً في دراسات تعقب الأسلاف خلال التطور والهجرة، إذ قد تحصل تنوعات في الطفرات تؤثر في جزيئات الـ DNA بطرق مختلفة.

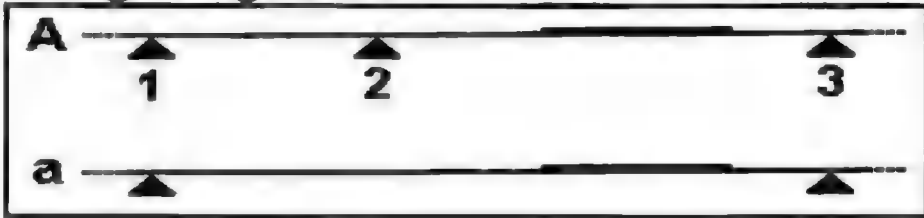
يُشير مُصطلح التباين (التنوع Polymorphism) إلى الاختلافات الطفيفة بين الأفراد في تسلسلات أزواج القواعد للجينات المشتركة، وعلى الرغم من أن كل أفراد النوع الواحد يمتلكون بشكلٍ أساسي البنية الوراثية نفسها، فإن هذه الاختلافات الطفيفة تتمثل في الاختلافات المظهرية (سواء كان المظهر الخارجي أو الأيض... الخ) بين الأفراد.

تتضمن طريقة العمل قطع مناطق مُعيّنة من الـ DNA ذات تغاير معروف بالإنزيمات القاطعة، ثم فصل القطع المتكوّنة بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الأجاروز، وإجراء وصمة سودرن، وتحديد عدد القطع والحجوم النسبية، إذ يمكن أن يختلف نمط القطع من فردٍ لآخر.

وهنا يمكن أن يستعمل التحليل الذي يقيس قطع الـ DNA التي تحتوي على تسلسلات قصيرة مختلفة من شخصٍ لآخر، أو ما يُسمى بالـ VNTRs. فبعد استخلاص الـ DNA من العينة وتضخيمها بالـ PCR، تُضاف إنزيمات قاطعة تقطع في نقاط مُعيّنة من الـ DNA، وتُطبق وصمة سودرن، ويتم تحديد عدد المرات التي تتكرر بها الـ VNTRs، فإذا ظهرت عيتان مختلفتان بسبب اختلاف أطوال VNTRs فهذا يعني أنهما لا تعودان للشخص نفسه. من جهةٍ أخرى إذا احتوت العيتان على أطوال VNTRs نفسها، فإنه من الممكن أن تعودان للشخص نفسه أو لشخصين يمتلكان VNTRs بالطول نفسه في ذلك الموقع. وعليه لا بُدَّ هنا من استعمال VNTRs كافية من الفردين، وذلك لتقليل احتمالية التوافق التطابقي إلى ما يُقارب الصفر. ومن الجدير بالذكر أن RFLP يحتاج إلى خطوات كثيرة، كما أن فترة إنجازه طويلة نسبياً، لذلك قد يُستعاض عنه بتقنيات أحدث وأسرع.

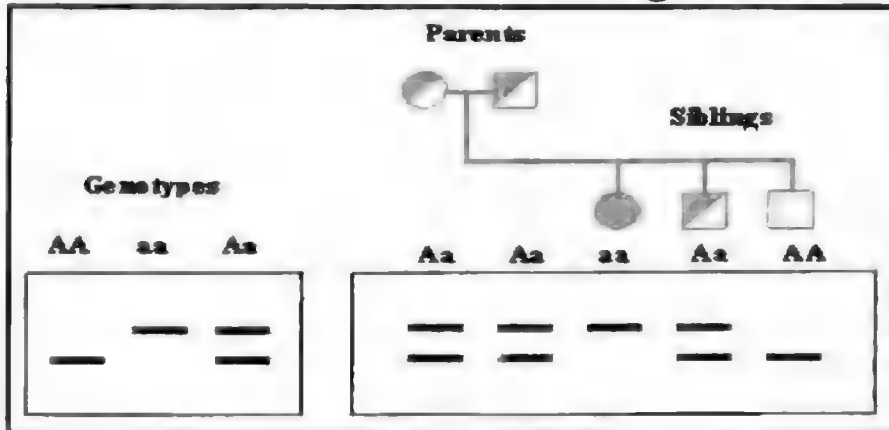
وقد ذكرنا أعلاه التركيز على RFLP لاستغلاله في تقديم معلومات قيمة في مجالات بيولوجية مختلفة، وربما كان جُل الاهتمام قد تركّز على:

1. مسح وتنقيب DNA الإنسان حول وجود جينات ضارة بالصحة.
 2. تقديم دليل البراءة أو الاتهام في المشاكل الجنائية باستعمال بصمة الـ DNA.
- في المثال التالي (شكل 6 - 30) يتبين بأن هنالك قطعة صغيرة من الجينوم يمكن تحديدها بالمجس (الخط السميك). ففي الأليل A يُقطع الجينوم بواسطة الإنزيم القاطع في ثلاثة مواقع متقاربة (مؤشرة بالمثلثات)، ولكن سوف تظهر فقط القطعة الواقعة على أقصى اليمين بواسطة المجس. وفي الأليل a يُفقد موقع القطع الثاني بسبب طفرة وراثية، ولذلك فإن المجس يُحدّد قطعة أكبر مُندججة تبدأ من الموقع 1 إلى الموقع 3.



شكل (6 - 30). اختلافات عدد مواقع القطع في الأليلين

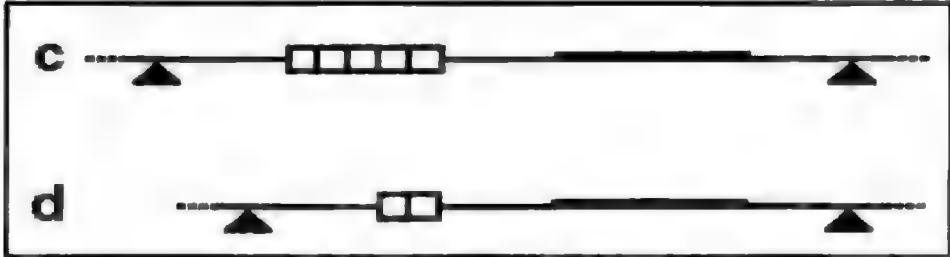
وعليه تظهر النتائج بعد تطبيق وصمة سوزن كالاتي (شكل 6 - 31):



شكل (6 - 31). اختلاف عدد الحزم المتكوّنة في تراكيب وراثية مختلفة بعد إجراء

وصمة سوزن بسبب اختلاف الـ RFLP

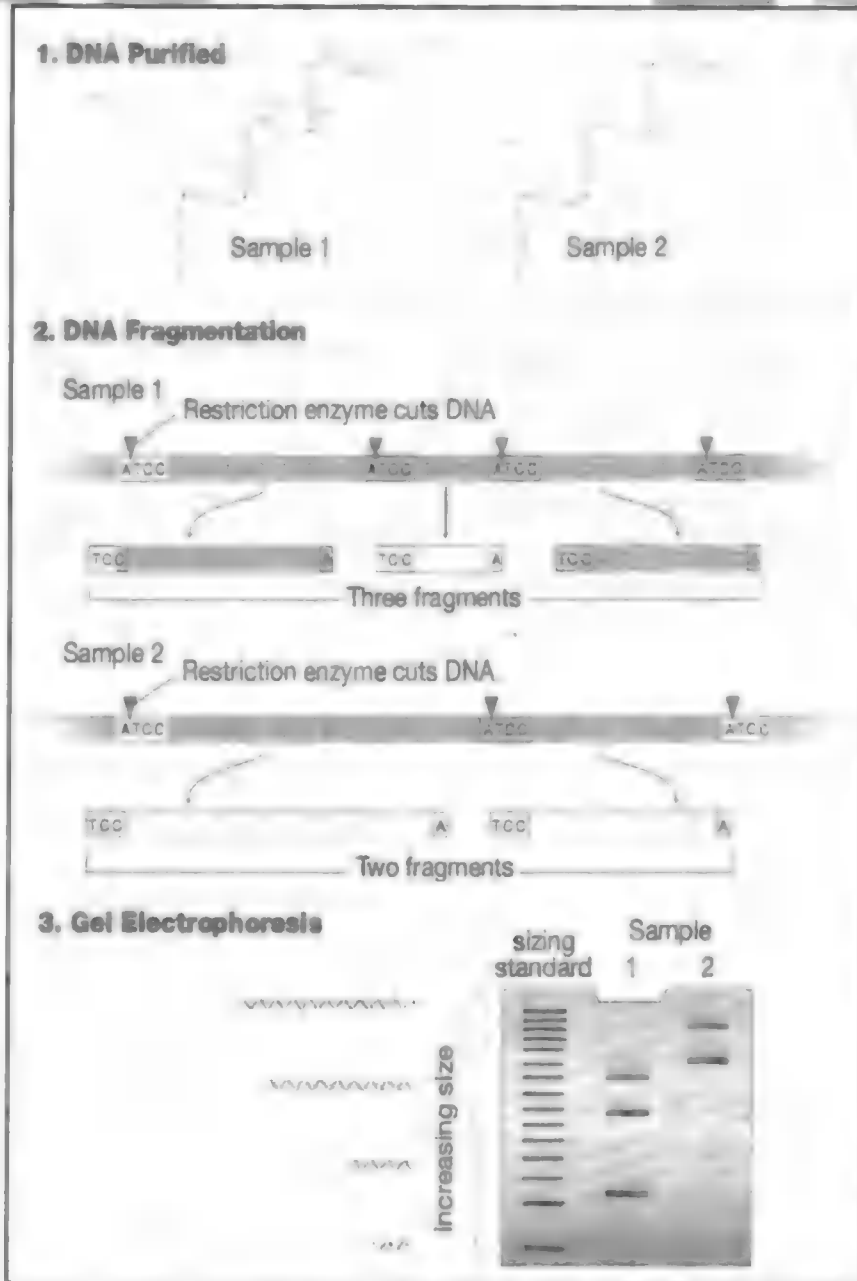
وفي المثال أدناه (شكل 6 - 32)، فقد تم اختيار المجس والإنزيم القاطع لتحديد منطقة من الجينوم تتضمن تغيّرات في VNTR (مؤشّرة بهيأة صناديق). ففي الأليل c هنالك خمس مُكرّرات في الـ VNTR والمجس يُحدّد قطعة أطول بين موقعي القطع. أما في الأليل d هنالك فقط متكرّرتان منها. وعليه يُحدّد المجس قطعة أصغر بين موقعي القطع نفسها.



شكل (6 - 32). اختلاف الطول في الحزم الواقعة بين موقعي القطع بسبب اختلاف عدد المتكرّرات من الـ VNTR

مع العلم بأن هنالك عمليات وراثية أخرى مثل الاندغامات (Insertions) والحذوفات (Deletions) والانتقالات (Translocations) والانقلابات (Inversions) تؤدي أيضاً إلى RFLP.

ويُبين الشكل (6 - 33) التباين بين عيّتين بسبب اختلاف عدد مواقع القطع، إذ تظهر في العينة 1 ثلاث حزم، وفي العينة 2 حزمتين.



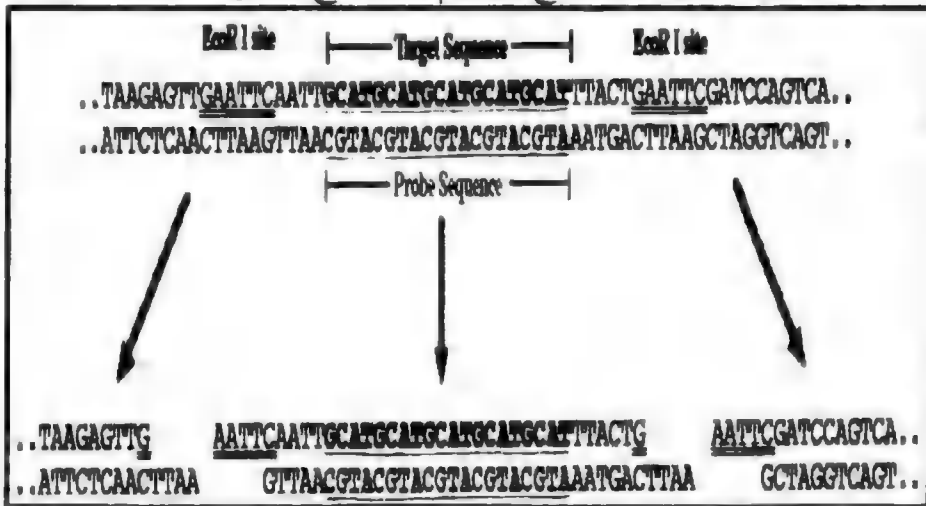
شكل (6 - 33). اختلاف عدد الحزم المتكوّنة في عيتين بسبب اختلاف مواقع القطع
تكوين الـ RFLP:

يتوارث كل فرد الـ DNA الخاص به من أبويه، وطالما أن الـ DNA يتضاعف خلال كل جيل، فإن أي تسلسل مُعيّن يمكن أن يُمرّر إلى الجيل التالي. إن الـ RFLP هو تسلسل من الـ DNA يمتلك موقع قطع على كل نهاية من نهايتي التسلسل الهدف (Target sequence) بحيث ينحصر هذا التسلسل بينهما. ويُعرف التسلسل الهدف بأنه أي قطعة من الـ DNA ترتبط بالمجس من خلال التزاوج القاعدي.

فلو تتبعنا RFLP مُعيّن يمكن التعرف عليه بواسطة الإنزيم *EcoRI* والتسلسل الهدف المُكوّن من 20 قاعدة:

GCAT GCAT GCAT GCAT GCAT

وعليه سوف تتكوّن بعد القطع بالإنزيم ثلاث قطع (شكل 6 - 34).



شكل (6 - 34). تتكوّن ثلاث قطع بعد التقطيع بالـ *EcoRI*، ولكن يمكن أن تهجن قطعة واحدة فقط مع المجس، وهي القطعة الهدف

ولو نظرنا إلى السيد جاك والسيدة جيل وقطع الـ DNA التي يحملونها، والتي تحتوي على RFLP (للتوضيح سوف نُبيّن أحد أشرطة الـ DNA) (شكل 6 - 35). وطالما أن كلا الشخصين ثنائيي المجموعة الكروموسومية، فسوف يمتلكان نسختين من هذا الـ RFLP. وعليه عندما نختبر النسخة الأولى لكل من جاك وجيل يتبيّن بأنها متماثلان.

Jack 1: G↓AATTC—(8.2kb)—GCATGCATGCATGCATGCAT—(4.2kb)—G↓AATTC-

Jill 1: G↓AATTC—(8.2kb)—GCATGCATGCATGCATGCAT—(4.2kb)—G↓AATTC-

شكل (6 - 35). تمثيل الشخصين بوجود قطعة واحدة (12.4 kb) تحصر الـ DNA الهدف في وسطها

ولكن عند اختبار النسخة الثانية لهذا الـ RFLP نلاحظ بأنها غير متماثلان (شكل 6 - 36)، إذ إن نسخة جاك الثانية (Jak-2) تفقد موقع القطع بالـ *EcoRI* والذي يتواجد في نسخة جيل الثانية (Jill-2) عند مسافة 1.2 kb فوق مجرى الجين بالنسبة للتسلسل الهدف (الاختلافات مؤشرة بالحروف المائلة ومرسوم تحتها خط).

Jack 2: G↓AATTC—(1.8 kb)-CCCTTT—(1.2 kb)—

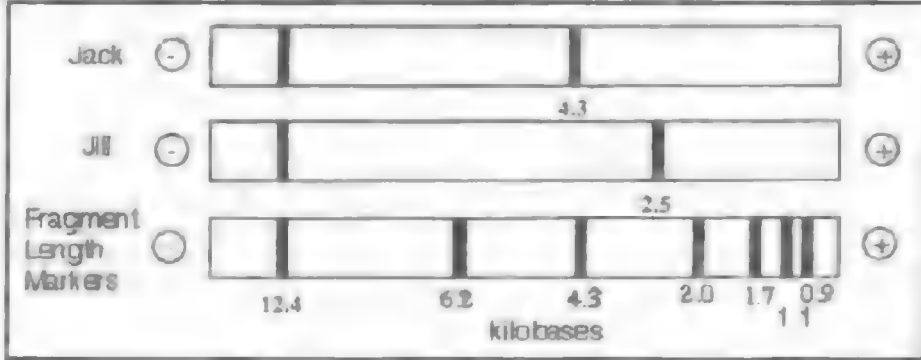
GCATGCATGCATGCATGCAT—(1.3 kb)— G↓AATTC-

Jill 2: G↓AATTC—(1.8 kb)- G↓AATTC—(1.2 kb)—

GCATGCATGCATGCATGCAT—(1.3 kb)— G↓AATTC-

شكل (7 - 36). اختلاف الشخصين بسبب اختلاف مواقع القطع في النسخة الثانية من الجينوم

ولذلك فعند إجراء تحليل الـ RFLP لجميع النتائج أعلاه، سوف نلاحظ حزمة واحدة مشتركة (12.4 kb) بين الشخصين ناتجة عن تمثيل مواقع القطع في النسخة الأولى، وحزمة أخرى في كل منهما ولكن غير متطابقة، وهي 4.3 kb في جاك محصورة بين موقعي الإنزيم (1.8 + 1.2 + 1.3 kb)، و 2.5 kb في جيل (1.3 + 1.2 kb)، إذ تظهر الحزمة 2.5 kb الخاصة بجيل-2 والحزمة 4.3 kb الخاصة بجاك-2 بعد إجراء وصمة سودرن مع المجس. في حين لا تظهر الحزمة 1.8 kb الموجودة في جيل-2 لأنها تقع خارج التسلسل الهدف. ونلاحظ النتيجة كما في الشكل (6 - 37).

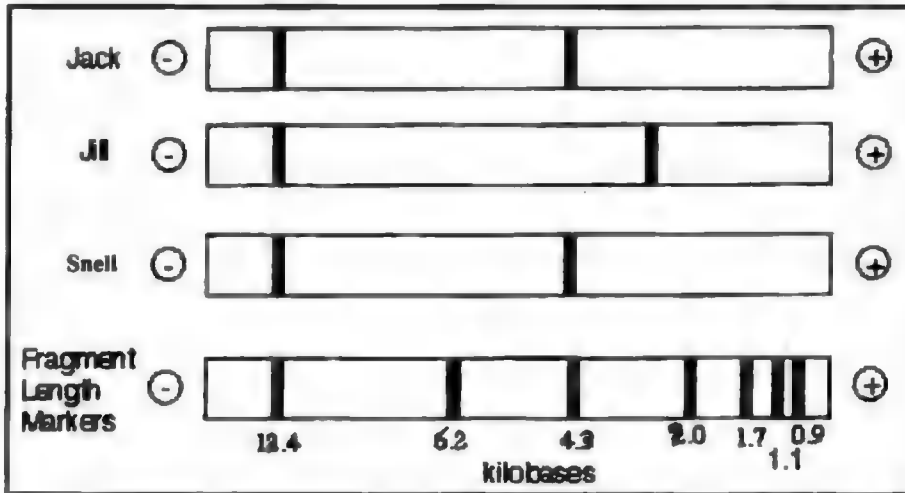


شكل (6 - 37). بصمة RFLP للسيد جاك والسيدة جيل

يشارك الشخصان بالحرمة kb 12.4، ويتفردان بالحزمة kb 4.3 و kb 2.5 لكل منهما على التوالي.

ولتوضيح استعمال الـ RFLP في إثبات شرعية الأبوة، نأخذ المثال الآتي:

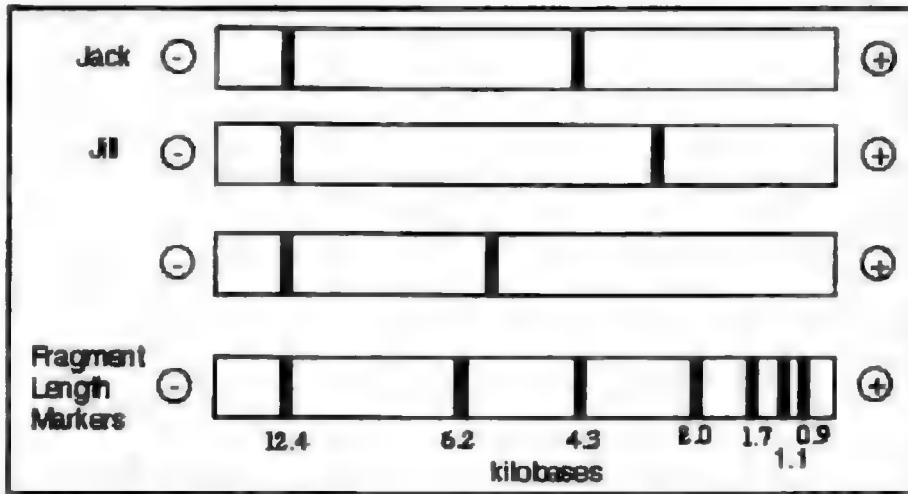
بالاعتماد على المثال السابق، سوف نستعمل تقنية الـ RFLP لتحديد كون السيد جاك هو أب لطفل السيدة جيل المسمى سنيل، إذ يتم استخلاص الـ DNA من خلايا الدم البيضاء للأشخاص الثلاثة المعنيين. وطُبّق تحليل الـ RFLP، وكانت النتائج كما في الشكل (6 - 38).



شكل (6 - 38). نتيجة بصمة RFLP للآب المزعوم (جاك) والأم (جيل) والطفل (سنيل)

في هذه الحالة يبدو أن جاك يمكن أن يكون الأب، طالما أن سنيل قد ورث القطعة kb 12.4 من أمه جيل، والقطعة kb 4.3 من جاك. ولكن مع ذلك لا بُدَّ من الانتباه بأنه من الممكن وجود رجل آخر يمتلك نمط RFLP نفسه بالنسبة لجاك، ولكي نكون متأكدين يجب اختبار مواقع جينية أخرى للـ RFLP، خصوصاً وأن من الاحتمالات الضعيفة جداً وجود شخصان (عدا التوائم الصنوية) يشتركان بأنماط RFLP متعدّدة، وبذلك نُحقق تأكيد النتائج المطلوبة وبأكبر قدر من الثقة.

وفي سيناريو آخر لها المثال، يمكن أن تكون النتائج مختلفة، بحيث تظهر كما في الشكل (6 - 39).

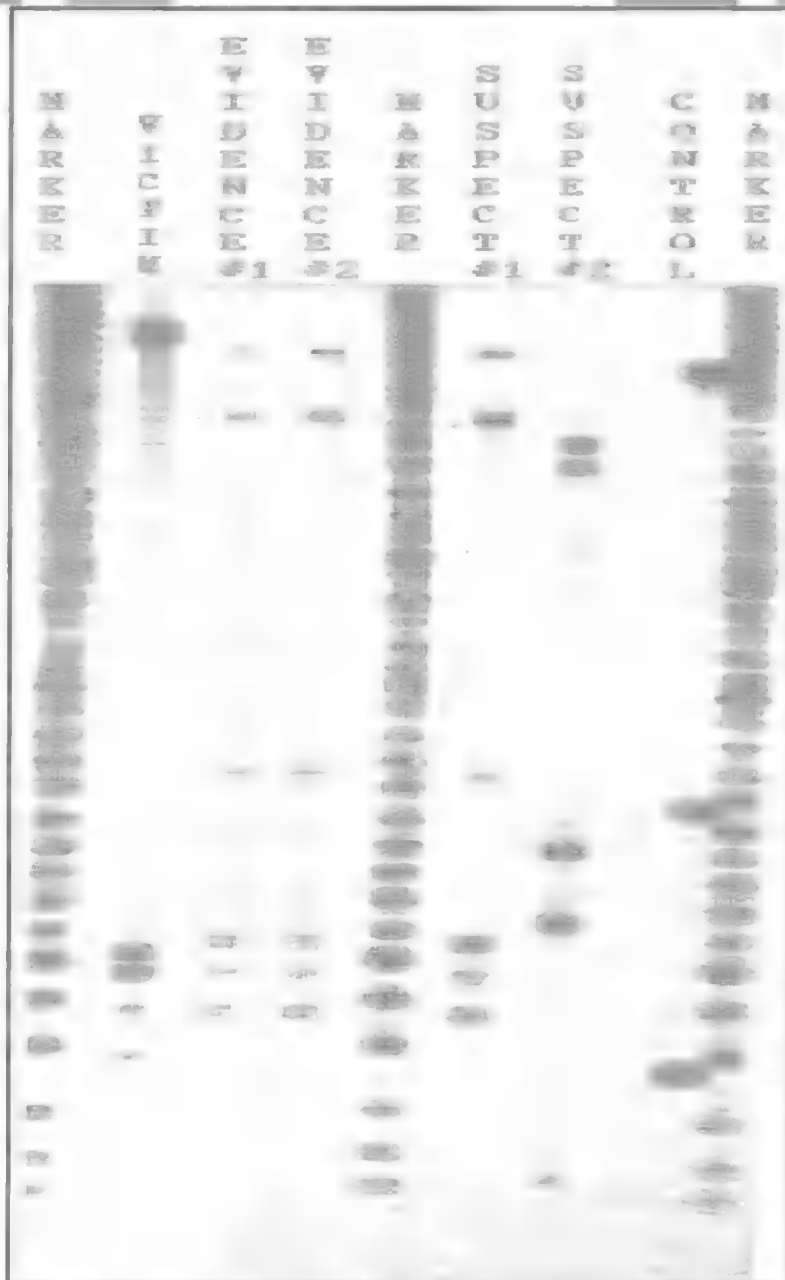


شكل (6 - 39). نتائج RFLP مختلفة للمثال السابق

في هذه الحالة يمكن القول بأن جاك ليس هو الأب، طالما أن سنيل يمتلك حزمة بحدود kb 6 غير موجودة في جاك، وعليه فإنه من المرجح جداً بأن جاك ليس هو الأب، ولكن علينا أن ننتبه إلى احتمالية ظهور هذه الحزمة في سنيل بسبب طفرة وراثية جديدة في هذا الموقع الجيني.

في الشكل (6 - 40) أدناه، نلاحظ نتائج RFLP لحالة اغتصاب، إذ استعمل فيها مجسّين، أحدهما يُظهر الحزم الموجودة في القمة، والآخر يُظهر الحزم الموجودة في القاعدة، وبخصوص عينات الـ DNA فقد كانت تتمثل من:

- سائل منوي أخذ من مهبل الضحية المغتصبة، الدليل رقم 2 (Evidence #2).
 - بقعة سائل منوي رُفعت من ملابس الضحية، الدليل رقم 1 (Evidence #1).
 - DNA الضحية نفسها (Victim) للتأكد بأن الـ DNA الذي نبحث عنه لم يأت من خلايا الضحية.
 - DNA من مُشتبهين بهما، المُشتبه به رقم 1، والمُشتبه به رقم 2 (Suspect #1 و Suspect #2).
 - طقم من قطع الـ DNA المختلفة الحجم، لقياس الأحجام الجزيئية (Marker).
 - DNA لشخص مُستبعد، للتأكد من عمل المجسات بشكل صحيح، كسيطرة (Control).
- من خلال قراءة النتيجة، نلاحظ بأن المُشتبه به رقم 2 يمكن استبعاده، خصوصاً وأنه لا توجد أي حزمة من حزمه متطابقة مع الحزم الموجودة في السائل المنوي.
- ولكن هل المُشتبه به رقم 1 هو المذنب؟
- وهنا نقول بأننا لسنا متأكدين 100%. وللتخمين، على فرض أن أليل ما (حزمة) قد يتواجد في 25% من الأفراد المفحوصة، فإن احتمالية التطابق العشوائي لأليلين هي $(0.25)^2$ أو 1 من 16. ولذلك فإن احتمالية تطابق 6 الأليلات، كما في هذه الحالة، تساوي $(0.25)^6$ أي 1 من 4096. وطالما أن المُشتبه به رقم 1 لم يتم اختياره عشوائياً في هذه الجريمة، بل لأسباب ترتبط بعلاقته بالجريمة، لذلك يمكن القول بأن دليل الإدانة هنا قوياً.

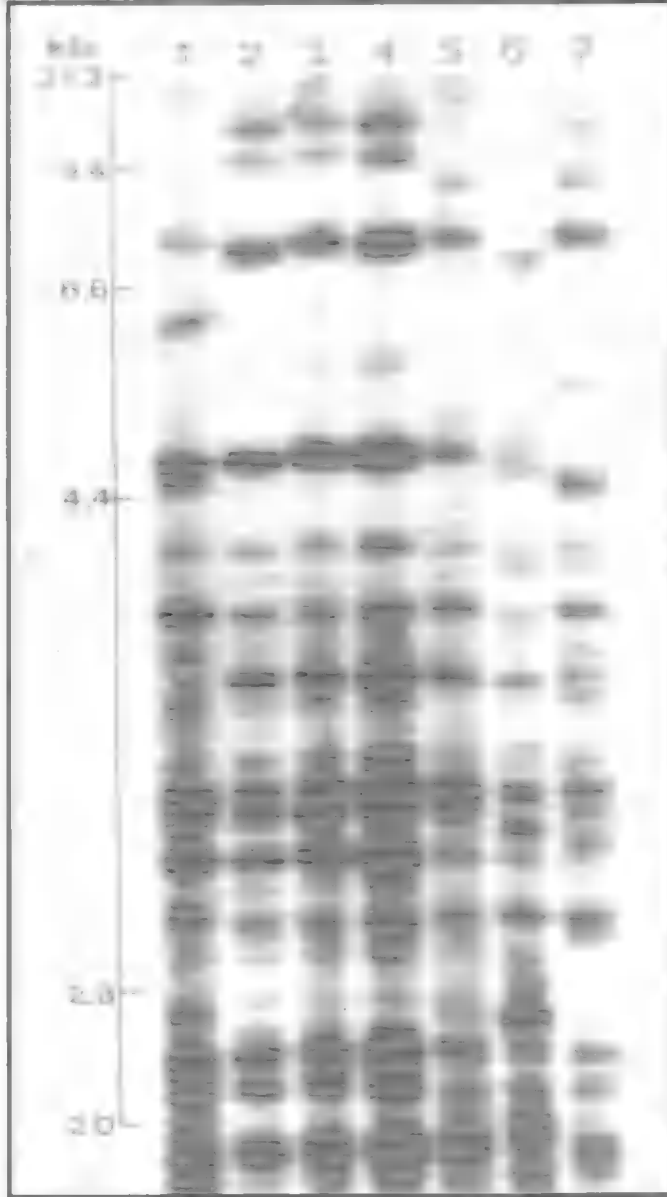


شكل (6 - 40). نتائج اختبار RFLP لجريمة اغتصاب

ولكن للتأكد نستعمل مجسات أخرى لزيادة الدقة، ومن ثم التوصل ودون شك إلى المجرم الحقيقي، فمثلاً إذا استعمل طاقم من المجسات يُعطي 14 حزمة لـ DNA المُشْتَبِه به متطابقة مع عينة السائل المتوي، فإن احتمالية الخطأ تقل إلى أقل من 1 من 268 مليون، أي أنه:

$$(0.25)^{14} = 1/268,435,456$$

وهذا أكثر من مجموع سكان الذكور والإناث في الولايات المتحدة الأمريكية. هذا وقد استعملت الـ RFLPs أيضاً في الحد من عمليات الاصطياد غير المشروع وإبادة الحيوانات البرية التي تدرّ أرباحاً طائلة للصيادين. ففي إحدى الحوادث ادعى الصياد بأن قرون حيوان الأيل (Moose) التي بحوزته تعود لحيوان واحد فقط، ولكن بصمة الـ RFLPs كشفت بأن هذه القرون تعود لأربعة حيوانات (شكل 6 - 41).



شكل (6 - 41). بصمة RFLP

أثبتت هذه البصمة بأن هنالك أربعة أبائل مختلفة. المجالات 2، 3، 4 تعود لإحدى العينات، المجالات 5، 6، 7 تعود للعينات الثانية والثالثة والرابعة. المجال 1 يمثل DNA لقياس الأحجام الجزيئية.

الفصل السابع

تباين الـDNA وأنواع المجسات المستعملة في العلوم الجنائية

الفصل السابع

تبين الـ DNA وأنواع المجسات المستعملة في العلوم الجنائية

أنواع الـ DNA (Types of DNA):

على الرغم من أن أغلب التركيز انصبَّ على الـ DNA المُشَفَّر إلى بروتينات، فإنه من المهم ملاحظة أن أقل من 10٪ (بحدود 3 مليون زوج نيوكليوتيدي) في جينوم الإنسان في واقع الأمر تؤدي وظيفة التشفير البروتيني. كما وأن أغلب مادتنا الوراثية غير معروفة الوظيفة، ولسهولة فهم كل أنواع الـ DNA فقد قُسم إلى ثلاثة أنواع (شكل 7-1) هي:

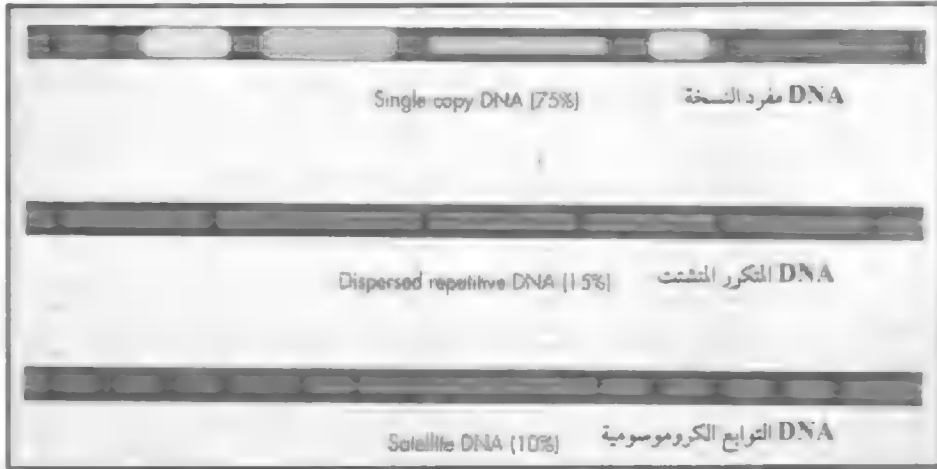
1. النوع الأول وهو الأكثر شيوعاً أو ما يُسمى بالـ DNA مفرد النسخة (Single-copy DNA)، وكما يُشير الاسم فإنه يمثل تسلسلات الـ DNA الموجودة مرة واحدة، أو في أحيان قليلة أكثر من مرة، في الجينوم، إذ تُشكِّل النسخ المفردة ما يُقارب 75٪ وتشمل الجينات المُشفَّرة للبروتين (Protein-coding genes)، ورغم ذلك فإن الـ DNA المُشَفَّر إلى بروتينات يمثل نسب قليلة في كل الـ DNA المفرد النسخة، والأغلبية الباقية تقع في الأنترونات (Introns: التسلسلات غير المُشفَّرة)، أو تقع في تسلسلات الـ DNA الواقعة بين الجينات.

2. المتبقي من النسبة والبالغ 25٪ من الجينوم يتكوّن في الـ DNA المتكرر (Repetitive DNA)، وهي تسلسلات تتكرر بكثرة في الجينوم، وغالباً آلاف المرات، ويُصنّف هذا النوع إلى صنفين رئيسيين:

أ. الـ DNA المتكرر المنتشت (Dispersed repetitive DNA): يكون متناثر بشكل مفرد على طول الجينوم، ولا يكون مترادف.

ب. DNA التوابع الكروموسومية (Satellite DNA): تتكرر التوابع الكروموسومية بهيأة مجاميع (عناقيد Clustered) سويةً على مواقع معينة في بعض الكروموسومات بشكل ترادفي (أي تبدأ بوحدة تتكرر بشكل مجاور للنهاية الأخرى وهكذا).

إن مصطلح توابع كروموسومية قد اشتق من كون حقيقة تركيب هذه التسلسلات، إذ يمكن فصلها بسهولة بواسطة الطرد المركزي باستعمال تدرج الكثافة بمحلول كلوريد السيزيوم (Cesium chloride) CsCl، إذ يبدو الـ DNA بهيأة توابع مفصولة عن بقية الـ DNA في تدرج الكثافة.



شكل (7 - 1). أنواع الـ DNA

تكون التكرارات المترادفة غنية بالأزواج القاعدية T-A ذات الأواصر الهيدروجينية المزدوجة مقارنةً بالـ C-G ذات الأواصر الهيدروجينية الثلاثية، ومن ثم فإن كثافة الطفو في متدرج الـ CsCl (بسبب وفرة الأواصر الثنائية على حساب الأواصر الثلاثية) تكون أقل من الحزمة الرئيسية للـ DNA التي تستقر في منطقة ذات كثافة طفو أعلى. وهذا المصطلح يجب أن لا يتداخل مع المصطلح الأصلي للتوابع الملحظة بواسطة المجهر على بعض الكروموسومات (كروموسومات 13 و 14 و 15 و 21 و 22) والتي تمثل مناطق تنظيم النوية (Nucleolar organizer regions) NORs (راجع

الفصل الثالث). إن DNA التوابع الكروموسومية يُشكّل ما يُقارب 10٪ بالنسبة للجينوم، ويُقسم تقسيمات ثانوية إلى:

أولاً: توابع ألفا (Alpha-satellite DNA) والذي يتكرر بشكل ترادفي في 171 زوج قاعدي، ويمكن أن يمتد إلى الملايين في أزواج القواعد أو أكثر طولاً، إذ يتواجد هذا النوع قرب مناطق السنترومير بالنسبة للكروموسومات.

ثانياً: التوابع الصغيرة (Minisatellites) وهي عبارة عن قوالب من التكرارات مترادفة، يكون طولها الكلي أقل بكثير من سابقتها، تتكوّن من تكرارات بطول 100 - 10 زوج قاعدي طولاً، (تُشير بعض المصادر إلى أن طولها ما بين 12 - 100)، ويبلغ طولها الكلي بعض الآلاف في أزواج القوالب أو قريب من ذلك، إذ تتواجد بهيأة مجاميع (عناقيد) يصل عددها إلى ما يقارب 3000 من المتكررات.

تميل التوابع الصغيرة إلى عدم الاستقرار، وأن عدد النسخ للتسلسل المحدّد في الغالب يزداد أو يقل من جيل إلى جيل تالي . ونتيجةً لذلك فإن طول الموقع الأليلي لتابع صغير مُعيّن يتغيّر بشكل كبير في المجموعة السكانية، حتى بين أفراد العائلة الواحدة. وبسبب هذا التغيّر العالي (Polymorphic) في الطول، فقد استعملت تسلسلاتها في التعرف على الأشخاص في الجرائم وتحديد الأبوة.

ثالثاً: التوابع الكروموسومية الدقيقة (Microsatellites) وهي أيضاً صغيرة ولكن وحداتها المتكررة تكون بحدود 2 و 3 و 4 زوج قاعدي طولاً، (تُشير بعض المصادر إلى أن طولها ما بين 1 - 5)، ويبلغ طولها الكلي أقل من بعض المئات من أزواج القواعد. ونموذجياً تتواجد بهيأة مجاميع (عناقيد) صغيرة بحدود 10 - 40 زوج قاعدي طولاً. وتتبعثر التوابع الدقيقة خلال الـ DNA، إذ يوجد أكثر من 100000 موقع أليلي لها في جينوم الإنسان.

إن إنزيمات تضاعف الـ DNA تعاني من مشاكل في مضاعفة مناطق الجينوم التي تحتوي على هذه التسلسلات المتكررة الصغيرة، وهذا يُسبب تغيّراً في طول الـ DNA خلال الأجيال. وبسبب التغيّر في أطوالها في المجموعة السكانية، فقد استعمل DNA التوابع الدقيقة في تحليل العلاقات بين المجاميع السكانية البشرية الإثنية المختلفة كما هو

المثال التالي: إذ إن عدداً كبيراً من علماء الأنثروبولوجيا (Anthropologists) يزعمون بأن النوع البشري الحديث نشأ من أفريقيا، وإذا كان ذلك صحيحاً فإن أفراد المجاميع السكانية الأفريقية المختلفة يجب أن يُظهروا تغيّراً أكثر في تسلسل الـ DNA مقارنةً بالمجاميع السكانية التي تقطن أوطان أخرى، وذلك لأن جينوم المجاميع الأفريقية مضى عليه وقت أطول من التشعب التطوري. وبالفعل فقد دُعِمت الفرضية من خلال دراسة الـ DNA البشري.

يملك النوعان الأخيران من التوابع أهمية كبيرة في الدراسات الوراثية البشرية، كما أنها مهمتان جداً في دراسة الخرائط الجينية.

أما بخصوص الـ DNA المتكرر المشتت والذي يُشكّل 15٪ من الجينوم، فإن متكرراته تقع في مجموعتين:

أولاً: العناصر المتفرقة القصيرة SINES (Short interspersed elements).

ثانياً: العناصر المتفرقة الطويلة LINES (Long interspersed elements).

إذ يتراوح حجم الـ SINES المفردة من 90 - 500 زوج قاعدي، أما الـ LINES فتصل إلى 7000 زوج قاعدي. كما أن أهم أنواع الـ SINES ما يُسمّى بمتكررات ألو (Alu-repeats) إذ اشتق مصطلح ألو من كون هذه الوحدات المتكررة بحدود 300 زوج قاعدي تحتوي على تسلسل DNA يمكن قطعه بالإنزيم القاطع *Alu*. إن متكررات ألو عبارة عن عائلة من الجينات تمتلك DNA شديد التشابه. ينتشر ما يُقارب 300000 - 500000 من متكررات *Alu* خلال الجينوم (راجع الفصل الثالث)، إذ تكمن النقطة المهمة لهذه التسلسلات بإمكانية توليد نسخ من نفسها يمكن أن تدخل في أجزاء أخرى في الجينوم، وهذا الاندغام يمكن أن يقع في بعض الأحيان في مناطق الجينات المُشفّرة للبروتينات مُسبباً بعض الأمراض الوراثية.

وقد سميت أيضاً بالتسلسلات الرحالة أو المتقلة (Normadic sequences) لقدرتها على الهجرة من موقع إلى آخر في الجينوم، والتي من المعتقد أن تُناظر العناصر القافزة (Transposable elements) في الكائنات بدائية النواة.

إن وظائف الـ DNA عالي التكرار الذي يقع على مناطق الكروماتين المتباين (Heterochromatic regions) الغير نشطة وراثياً في الكروموسومات غير واضحة تماماً، ولكن الافتراضات المطروحة حول هذه الوظائف رغم الحاجة إلى البحث والتأكد اشتملت على:

1. أدوار تركيبية أو تنظيمية في الكروموسومات.
2. اشتراكها في ازدواج الثنائيات الكروموسومية أثناء الانقسام الاختزالي.
3. اشتراكها في عملية العبور الوراثي (Crossing over) أو إعادة التشكيل الجيني (Recombination).
4. أدوار حماية للجينات التركيبية المهمة مثل جينات المستونات، وجينات الـ rRNA أو جينات البروتينات الرايوسومية.

كما يعتقد بعض الباحثين بأن لها أدوار تنظيمية في عملية التعبير الجيني (Gene expression) خصوصاً وأن تسلسلات الـ DNA متوسطة التكرار (رغم أن التسلسلات عالية التكرار أو متوسطة التكرار لا تُستنسخ ولا تُترجم) تقع بمحاذاة الجينات التركيبية (الجينات الفعالة المُشفرة إلى بروتينات) المتمثلة بالـ DNA مفرد النسخ.

التغايرات التي يُعتمد عليها في إجراء البصمة الجينية:

1. البصمة المعتمدة على التغاير العددي في تنوعات التكرارات المترادفة

Variable number of tandem repeat polymorphisms

إن الأسلوب المستعمل في العادة لتحديد وجود أو غياب موقع قطع إنزيمي يُسمى تباينات أو تنوعات منطقة القطع RSPs (Restriction site polymorphisms). وفي هذه الحالة، فإن هذا التنوع سوف يمتلك أليلين ممكنين يحتلان جزءاً محدداً من كمية التنوع الوراثي (Genetic diversity) يمكن ملاحظته. كما يمكن ملاحظة تنوع أكثر إذا كان نظام التباين يمتلك أليلات كثيرة وليس اثنين فقط، والتباين في أسلوب الـ RFLP يُعطي مثل هذه الحالة تماماً. كما أن هذا التغاير الخاص يُستثمر فيه

ما يُسمى بالتتابع الكروموسومية الصغيرة (Minisatellites) الموجودة في الجينوم (Genome: جينوم أو مجين وهو المجموع أو المحتوى الجيني)، وهي عبارة عن مناطق فيها تسلسل الـ DNA نفسه يتكرر بشكل سلاسل مترادفة. تتكوّن تجمعات التتابع الصغيرة نموذجياً من 10 - 100 من النيوكليوتيدات، كما هو الحال في الشكل (7 - 2).

5'- GACTGCCTGCTAAGAT GACTGCCTGCTAAGATC
GACTGCCTGCTAAGAT GACTGCCTGCTAAGATCT
GACTGCCTGCTAAGAT GACTGCCTGCTAAGATAA
GACTGCCTGCTAAGAT GACTGCCTGCTAAGATGA
TGACTGCCTGCTAAGAT - 3'

شكل (7 - 2). تجمعات (عناقيد) التتابع الصغيرة

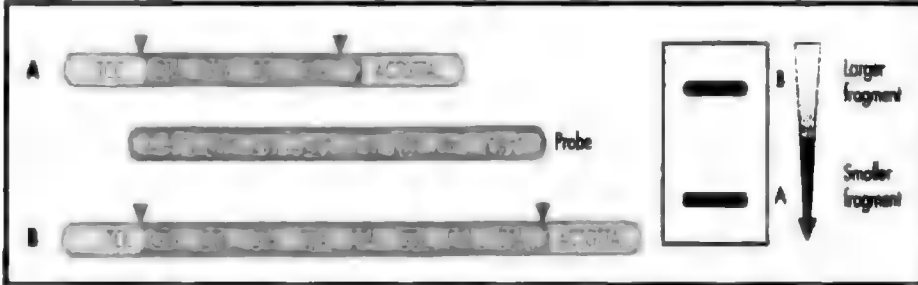
فهو يتكوّن من 9 متكررات مترادفة (موشّر تحتها خط) تتشكّل من 16 زوج قاعدي للتسلسل: GACTGCCTGCTAAGAT. هذا مع العلم بأن بعض الدراسات أشارت إلى أنها تتكوّن من مجاميع من النيوكليوتيدات يتراوح طولها من 2 - 100 نيوكليوتيدة. فعلى سبيل المثال التسلسل

GGAAG GGAAG GGAAG GGAAG

يتكوّن من أربع متكررات مترادفة من 5 نيوكليوتيدات، وأشارت أيضاً بأن التكرار النموذجي لتجمعات التتابع الصغيرة هو من 14 - 100 من النيوكليوتيدات. في حين ذكرت دراسات أخرى بأنها تتكوّن من 20 - 70 زوج نيوكليوتيدي طويلاً. تنتشر عناقيد كهذه بكثرة في جينوم الإنسان. وإن عدد المتكررات في كل موقع جيني (Locus) يتراوح من 2 إلى أكثر من 100، إذ تُسمى هذه المواقع الجينية VNTRs (Variable number of tandem repeats). وبما أن التغير الوراثي يُقاس بعدد التكرارات الموجودة في المنطقة المتباينة من فرد لآخر، لذلك سُميت بالتغير العددي للتكرارات المترادفة أو VNTRs. إن عدد المتكررات للموقع الجيني يتغير، وكل تغير

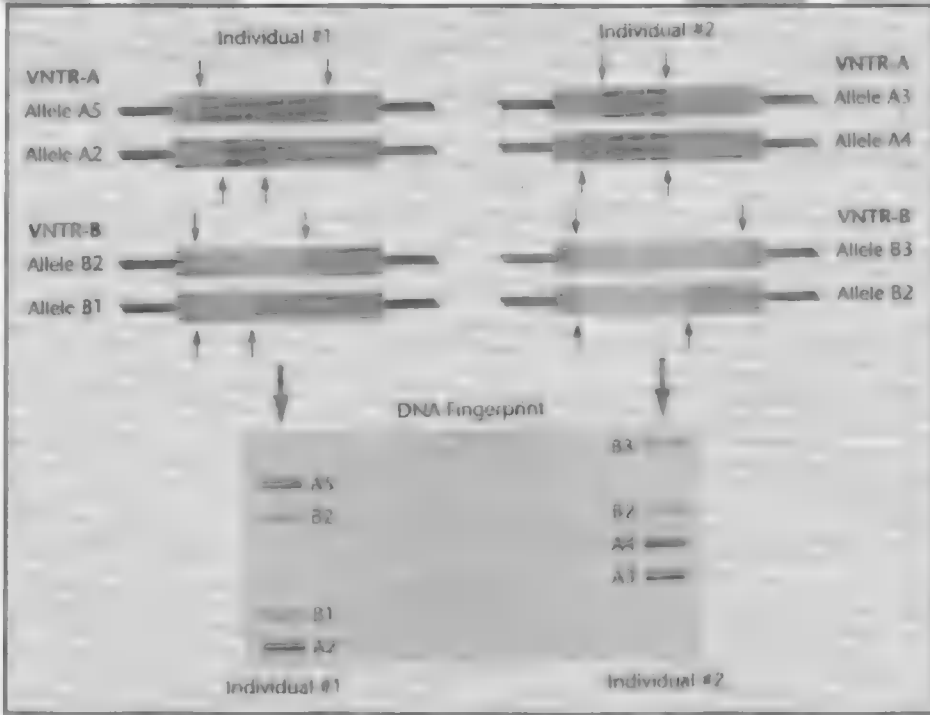
هو VNTR أليلي. مع العلم بأن عدد كبير من المواقع الجينية (Loci) يتمثل بدرازن من الأليلات مما ينتج عن ذلك شيوع التباين الزايجوتي (Heterozygosity).

يمكن تحديد الـ VNTRs باستعمال أسلوب مُشابه للـ RFLPs، فبعد تقطيع الـ DNA بإنزيم قاطع، تُرحل القطع وتُسخن (Denaturation) وتُطبق وصمة سودرن. إن الاختلاف الرئيسي عن الـ RFLPs يكمن باستعمال مجسات خاصة للتهجين الجزيئي تتجهن فقط مع مناطق التوابع الكروموسومية الصغيرة. وفي الوقت الذي تعكس فيه الـ RSPs تنوعات بسبب وجود أو غياب موقع قطع إنزيمي فإن الـ VNTRs تعكس تنوعات بسبب الأعداد المختلفة للمتكررات الواقعة بين موقعين للقطع (شكل 3 - 7). إن عدد هذه المتكررات يمكن أن يتباين بشكل واضح في المجاميع السكانية، فقد تمتلك مناطق التوابع الكروموسومية الصغيرة أعداد قليلة من هذه المتكررات (اثنين أو ثلاث) أو عدد كبير يصل إلى العشرين أو أكثر. لذلك يعكس هذا التباين درجة عالية من التباين الوراثي (Genetic variation) في الإنسان. لذلك فهي تختلف كثيراً من شخص لآخر (شكل 4 - 7). ومن الجدير بالذكر بأن هذا الموضوع يُشكل أهمية خاصة أيضاً في رسم الخرائط الجينية المستعملة في تحليل الارتباط (Linkage analysis).



شكل (7 - 3). تنوع الـ VNTR

إن الاختلاف في أطوال الحزم A و B (الشكل اليمين) ينتج عن الأعداد المختلفة للمتكررات المترادفة في DNA كروموسومين مختلفين. تُشير الأسهم إلى مواقع القطع الإنزيمي على جوانب المناطق المتكررة، كما يُلاحظ المجس القابل للتهجين مع الـ DNA لإظهار القطع المتباينة في الطول (الشكل الأيسر).

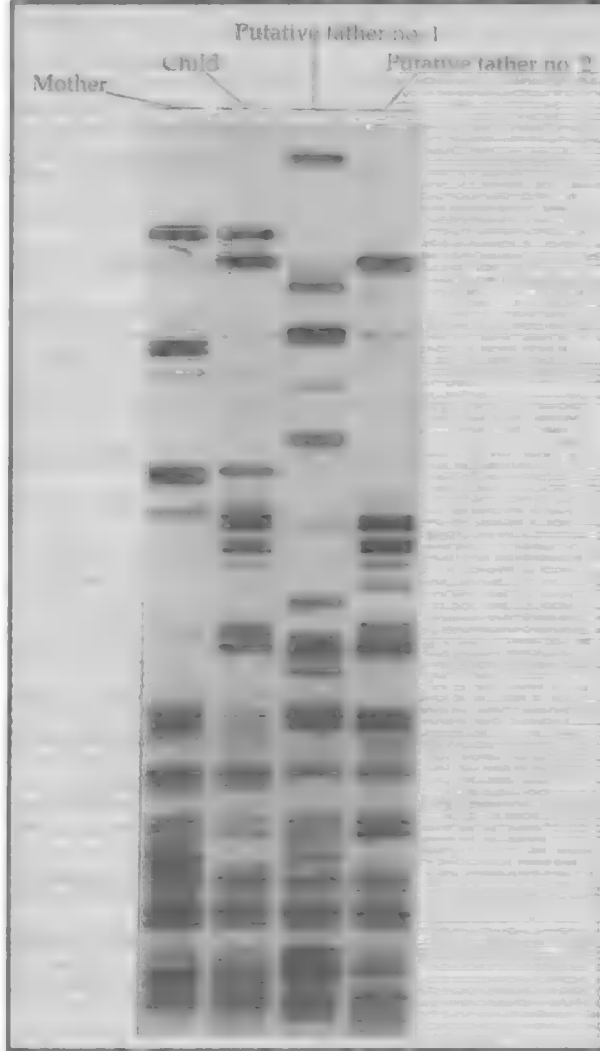


شكل (7 - 4). مواقع VNTR وعلاقة ذلك ببصمة DNA

تُلاحظ أليلات VNTR في موقعين كروموسوميين (A و B) لشخصين. تُشير الأسهم إلى مواقع القطع الإنزيمي على جوانب VNTR (في الشكل الأعلى). يتج عن ذلك سلسلة من القطع التي يمكن تحديد هياكلها على هيئة حزم عند تطبيق وصمة سوفرن (في الشكل الأسفل). بسبب اختلاف عدد التكرارات لكل موقع جيني فإن النمط الكلي للحزم يختلف في الشخصين رغم وجود حزمة مشتركة (الحزمة المثلثة للأليل B2).

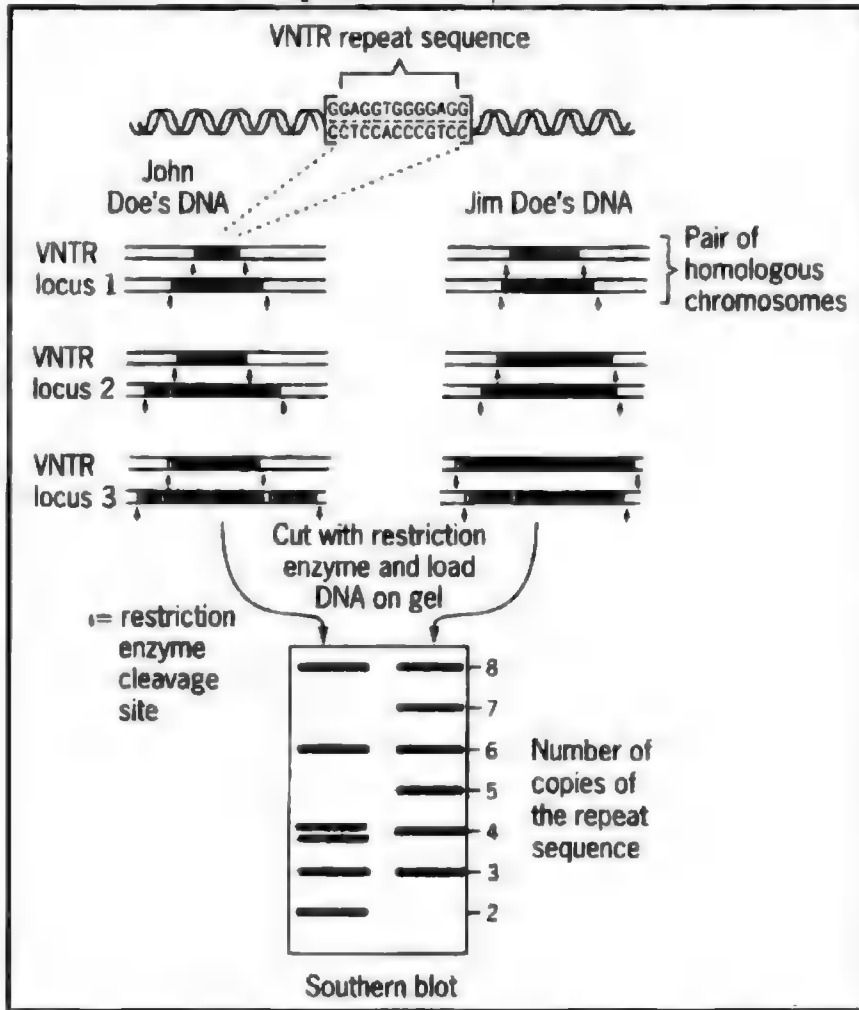
إن هذا النوع من التغيرات مكن الباحثين من إنجاز بصمة DNA على عينات صغيرة (أقل من 60 مايكروليتر من الدم)، ويمكن تطبيق ذلك على عينات قديمة جداً كما هو الحال للمومياة المصرية التي تجاوزت أعمارها 2400 سنة، الأمر الذي زاد من أهميتها التطبيقية وعلى مستويات مختلفة. ولكن هذه التقنيات سواء كانت RFLPs أو VNTRs، تتطلب تضخيم كمية DNA بالPCR في كثير من الأحيان.

لقد استعمل هذا النوع من البصمات في مشاكل شرعية عديدة مثل إثبات الأبوة Paternity testing (شكل 7 - 5)، وإثبات الأخوة (شكل 7 - 6)، وتحديد المجرم المشتبه به Criminal suspect (الشكلين 7 - 7 و 7 - 8).

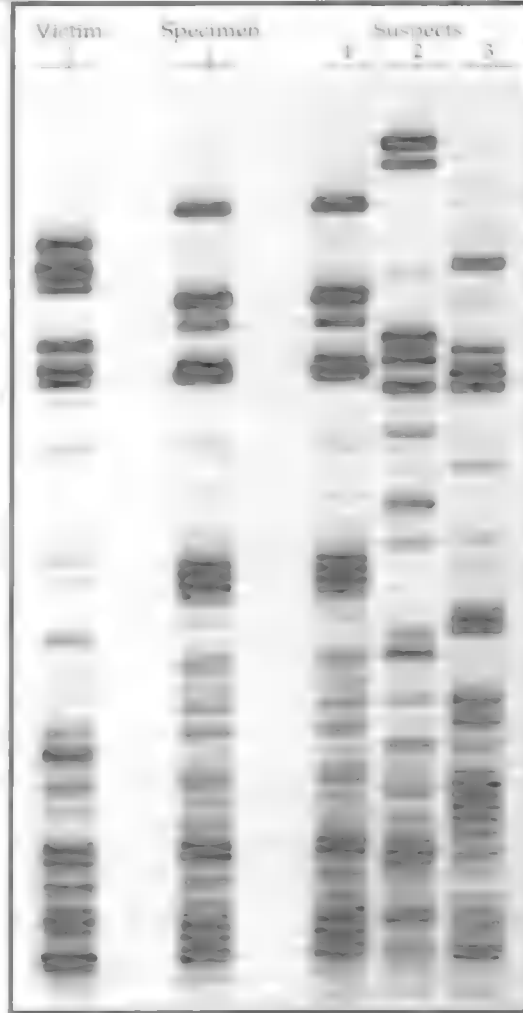


شكل (7 - 5). بصمة الـ DNA لكل من الأم (المجال الأول من اليسار) وطفلها (المجال الثاني) ورجلين (رقم 1 و 2 في المجالين الثالث والرابع على التوالي) كلّ منهما يدّعي بأنه أباً للطفل.

ويلاحظ من خلال البصمة بأن الأب رقم 2 هو الأب البيولوجي للطفل.

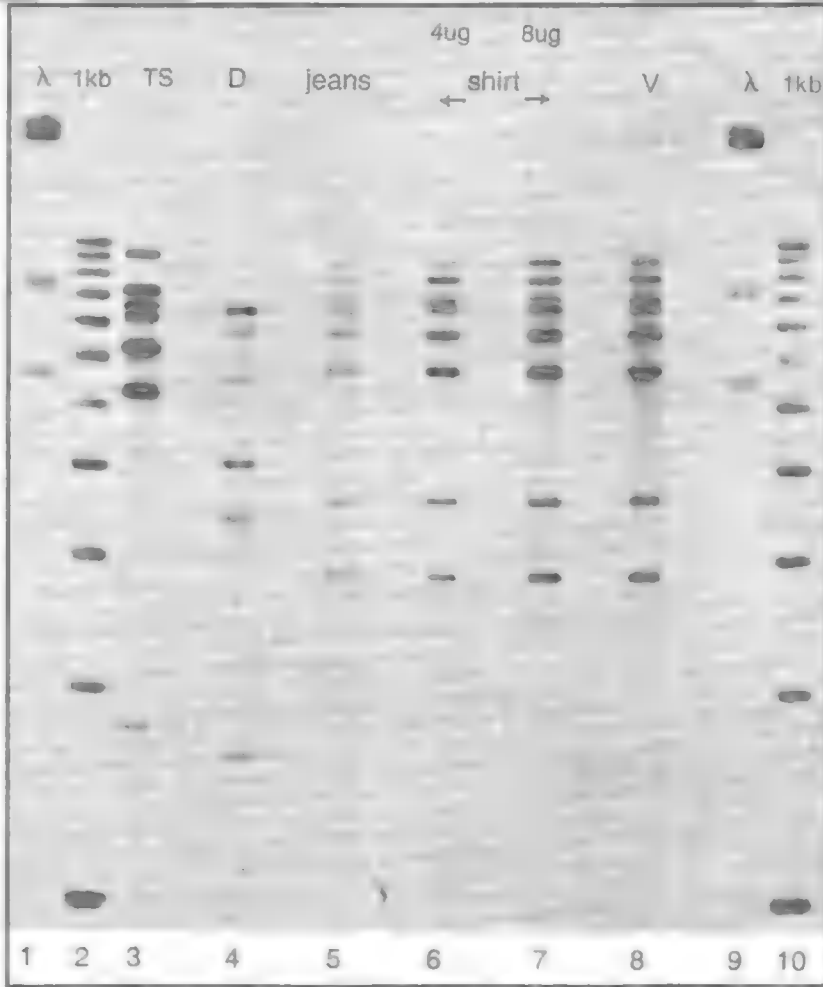


شكل (6 - 7). تخطيط مبسط لاستعمال الـ VNTR في تحضير بصمة الـ DNA



شكل (7 - 7). استعمال الـ VNTR في إجراء بصمة DNA

البصمة مُحَضَّرَة من DNA معزول من بقعة دم في موقع الجريمة (عينة الدليل - المجال الثاني)، ومن دم تم الحصول عليه من ثلاثة أشخاص مُشتبه بهم بارتكاب الجريمة مرقمين بالأرقام 1، 2، 3 (ويحتلون المجالات: الثالث والرابع والخامس على التوالي)، فضلاً عن بصمة DNA الضحية التي تحتل المجال الأول من اليسار. يظهر من النتيجة تطابق البصمة للمُشتبه رقم 1 مع بصمة بقعة الدم المتواجدة في مسرح الجريمة، وهذا يدل على كونه بالفعل هو المُرتجح بكونه الجاني. في حين تختلف بصمة المُشتبه بهم رقم 2 و 3 عن بصمة بقعة الدم.



شكل (7 - 8). الاعتماد على الـ VNTRs لتحديد بصمة الـ DNA

المختبر العلي النموذجي يُحلّل ما يقارب 13 موقع أليلي للـ VNTRs المعروفة بتغايرها العالي. في هذا الشكل استعملت بصمة الـ DNA في كشف حالة جرمية فيها المدعى عليه كان متهم بقتل فتاة طعنًا بالسكين. لقد تم مقارنة البصمة الوراثية لبقع الدم الموجودة على البنطلون والقميص للمتهم مع بصمة الـ DNA لعينات دم مأخوذة من المتهم والضحية، إذ لوحظ بأن الـ DNA من بقع الدم للملابس المتهم لا تُطابق الـ DNA الدم المأخوذ منه، ولكنها تطابقت مع الـ DNA الضحية. المجالات أعلاه تحتوي DNA من المصادر أدناه: 1، 2، 3، 9، 10: هي عينات DNA سيطرة وتفيد كدلائل حرجية؛ 4: دم المتهم؛ 5: بقعة دم من بنطلون المتهم؛ 6، 7: بقع دم من قميص المتهم؛ 8: دم الضحية. أثبتت هذه البصمة تورط المتهم في قتل الفتاة.

2. البصمة المعتمدة على التتابع الكروموسومية الدقيقة:

تشابه التتابع الكروموسومية الدقيقة STRs (Microsatellite) مع التتابع الكروموسومية الصغيرة VNTRs (Minisatellite) بحيث يمكن أن تتباين بالطول نتيجة لوجود اختلاف في عدد التكرارات، ولكن طول التكرارات في التتابع الدقيقة يكون أصغر مقارنةً بالتتابع الصغيرة، فهي تتكوّن من 2، 3 أو 4 زوج قاعدي طويلاً، ويُشار إلى ذلك بالنيوكليوتيدات الثنائية (Dinucleotides) أو الثلاثية (Trinucleotides) أو الرباعية (Tetranucleotides) على التوالي. فإذا كانت رباعية مثلاً متكررة مرتين: CTGA CTGA، أو متكررة ثلاث مرات: CTGA CTGA CTGA، أو متكررة أربع مرات CTGA CTGA CTGA CTGA وهكذا.

يمكن حدوث تكرار للتتابع الدقيقة بشكل مترادف لعدد من مئات المرات، وهذا العدد يتباين بشكل واضح بين الأفراد، وفي العادة بين الكروموسومين المتناظرين (Homologous chromosomes) للفرد الواحد.

تكمن الاختلافات بين تنوعات تكرار التتابع الكروموسومية الدقيقة (Microsatellite repeat polymorphisms) والـ VNTRs في أمرين:

- أ. في اختلاف الحجم، كما أُشير إليه أعلاه.
- ب. لا يمكن التعرف على التباين في التتابع الكروموسومية الدقيقة بالتقطيع الإنزيمي المستعمل في تقنية بصمات الـ VNTRs، وإنما تستعمل تقنية الـ PCR لعزلها والتعرف عليها، في حين تحتوي الـ VNTRs على مواقع قطع إنزيمية تقع على جوانبها (خواصها).

تحتل تنوعات تكرار التتابع الكروموسومية الدقيقة أيضاً أهمية استثنائية في رسم الخرائط الجينية، فهي تتوفر أكثر من الـ VNTRs وأكثر انتشاراً في الجينوم، وأسهل اختباراً في المختبر. لذلك أصبحت الخيار المفضل في دراسة أغلب الخرائط الجينية. ولكن كلا النوعين من هذه التنوعات، سواء VNTRs أو تنوعات تتابع كروموسومية دقيقة، مهم في التطبيقات الجنائية.

تستعمل حالياً التتابع الدقيقة بشكل روتيني شائع كمعلومات في اختبار شرعية الأبوة، ففي المثال التالي (جدول 7 - 1)، استعمل 11 من معلومات التتابع الدقيقة لاختبار العينات من الأم وطفلها والأب المزعوم، إذ إن الموقع الجيني للتابع الدقيق مؤشّر على يسار الجدول، والطرز الوراثي لكل فرد سُجّل بهيئة عدد المتكررات التي تحملها هي أو يحملها هو في ذلك الموقع. فعلى سبيل المثال عند الموقع D9S302، تحمل الأم 30 من المتكررات في أحد كروموسوماتها و 31 من المتكررات على الكروموسوم الآخر. الحالات التي فيها يحمل الفرد العدد نفسه من المتكررات في كلا الكروموسومين، يسجّل فقط رقم مفرد (بعض الأرقام يليها رقم بعد الفارزة مثل 20.2 تتضمن تكرر جزئي فضلاً عن بعض المتكررات الكاملة).

جدول (7 - 1). معلومات التتابع الدقيقة الشائعة الاستعمال في إثبات شرعية الأبوة

Microsatellite locus			Alleged	Microsatellite locus			Alleged
Chromosome location	Mother	Child	Father	Chromosome location	Mother	Child	Father
D9S302	30	31	32	D5S1719	11	10.3	10
9q31-q33	31	32	33	5pter-5qter	11.3	11	10.3
D22S883	17	20.2	20.2	CSF1PO	11	11	10
22pter-22qter	22	22		5q33.3-q34		12	12
D18S535	12	13	11	FESFPS	11	12	10
18q12.2-q12.3	14	14	13	15q25-15qter	12	13	13
D7S1804	27	26	26	TH01	7	7	7
7pter-7qter	30	30	27	11p15.5			8
S3S2387	23	24	20.2	LIPOL	10	9	9
3p24.2-3pter	25.2	25.2	24				
D4S2386	12	12	12				
4pter-qter			16				

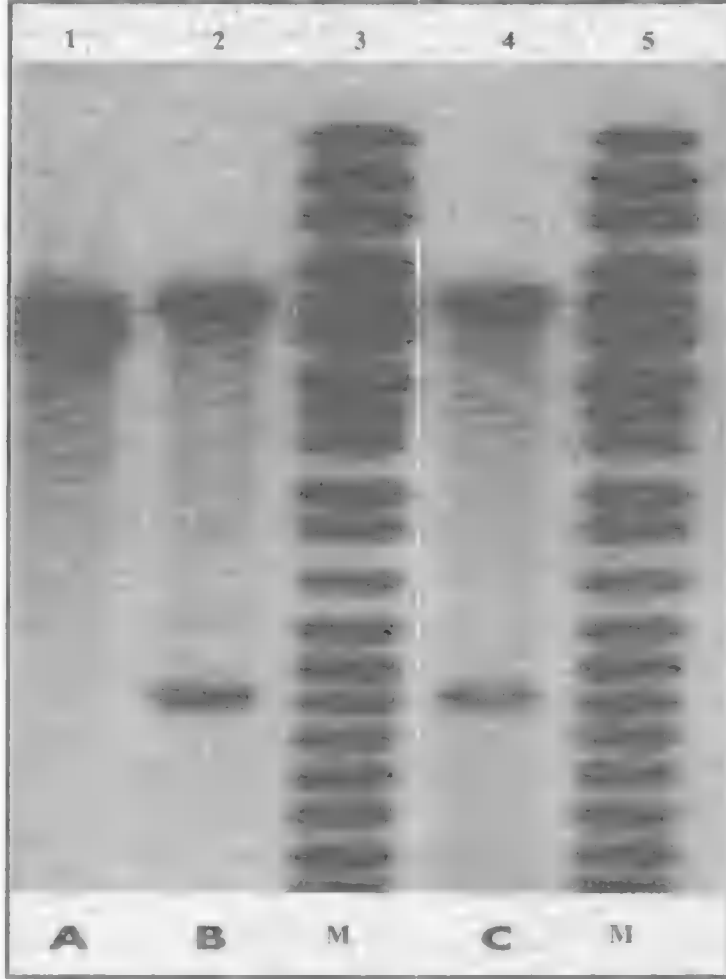
المجسات المستعملة في العلوم الجنائية:

يُعرف المجس بأنه عبارة عن قطعة صغيرة من الـ DNA لها القابلية على التهجين الجزيئي (التزاوج القاعدي) مع جزء نظير من الـ DNA المستهدف (المطلوب الكشف عنه)، إذ يتم تعليم المجس إما بنظير مشع مثل نظير الفسفور (P^{32}) أو بمواد لونية غير مشعة مثل البايوتين أو الديوكسيجينين.

في العادة يكون تسلسل المجس المستعمل معروف، وعند ارتباطه مع تسلسل محدد من الـ DNA المستهدف سيكوّن مع هذه المناطق حلزون مزدوج من الـ DNA مُعلّم من السهولة الاستدلال عليه. هذا وتعتمد قوة الارتباط على درجة التكامل بين شريطي حلزون الـ DNA المتكوّن، فكلما قلّت درجة التكامل ضعفت القوى الرابطة (عدد الأواصر الهيدروجينية بين النيوكليوتيدات المتقابلة) والعكس صحيح. هنالك نوعان من المجسات المستعملة في إجراء البصمة الجينية وهما:

1. المجسات أحادية الموقع (Single-locus probes):

تستطيع هذه المجسات تمييز DNA يوجد في موقع واحد فقط من الكروموسوم البشري، إذ تعتمد على موقع جيني واحد يوجد على الكروموسومين المتناظرين، ويحدّد صفة فردية للشخص ورثت من الأب والأم مناصفةً بينهما. وتُفضّل هذه المجسات الكاشفة في قضايا إثبات الأبوة والأمومة وما شابهها، لأن نتائجها واضحة وسهلة ودقيقة، ولكن قد تستعمل في كشف جرائم بعض الحالات الجنائية (شكل 7 - 9).



شكل (7 - 9). نمط لبصمة DNA

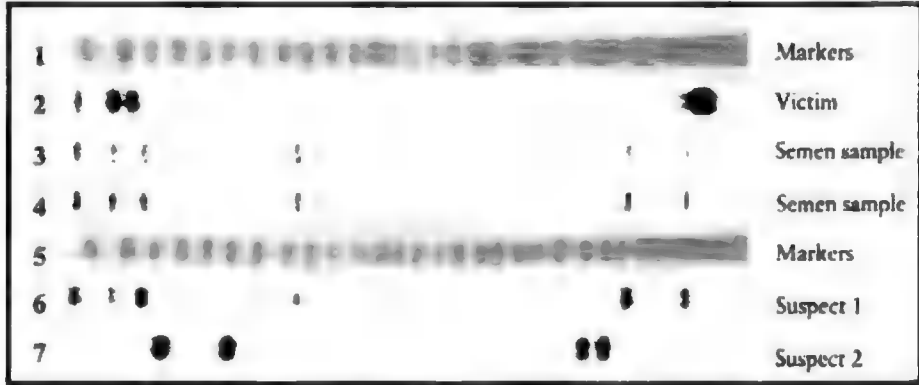
يُظهر التصوير الإشعاعي الذاتي بأن نمط حزم DNA للمشتبه A (المجال 1) لا يطابق نمط DNA المأخوذ من مسرح الجريمة C (المجال 4). في حين يتطابق نمط المشتبه B (المجال 2) مع نمط عينة مسرح الجريمة. ويستعمل دليل حجمي لقياس الحجم الجزيئي لحزم DNA مؤشر بالحرف M (المجالين 3 و 5). عملياً يتم اختبار عدد معين من أنظمة VNTRs أو التتابع الدقيقة لتقليل إمكانية التطابق الخاطئ.

2. المجسات متعددة المواقع (Multiple-loci probes):

تستطيع هذه المجسات الارتباط مع أكثر من موقع على الكروموسوم نفسه أو على مواقع تقع على كروموسومات مختلفة، ولهذا السبب فهي تستعمل للبحث عن معظم الصفات الوراثية المنتشرة على أزواج مختلفة من الكروموسومات المتناظرة، ولكن النتائج المتحصّل عليها في هذه الحالة تكون معقّدة نسبياً لكثرة عدد الخزم التي تُعطىها، ورغم ذلك تكون نتائجها دقيقة، وتُعتمد في حالات إثبات الأبوة والأمومة (شكل 7-5)، وفي حالات الاغتصاب والقتل (شكل 7-7).

ومن أكثر المجسات متعددة المواقع استعمالاً في كل من الحالات الجنائية والمدنية هما المجسّين المُشتقين من مواقع التوابع الكروموسومية للكروموسوم رقم 1 الذي يُشار إليه بالرمز 1cen-q24 والكروموسوم رقم 7 الذي يُشار له بالرمز 7q31.3. وقد كانت كافية لإدانة راندال جونز (Randall Jones) في قضية وفاة رو (Row) في فلوريدا (شكل 7-10)، إذ طمست سيارة جونز في الوحل، وخلال بحثه عن وسيلة لإخراج سيارته وجد عشيقين نائمين في الجزء الخلفي من سيارة نقل بيك آب واقفة في منحدر لصيد الأسماك، وقام بإطلاق النار على رأسيهما وسحب جثتيهما وأخفاهما بين الأخشاب. وبعد سحب سيارته بوساطة سيارة البيك آب عاد واعتدى جنسياً على المرأة (في مثل تلك الحالة يُعطي تشخيص الـ DNA ثقة بدقّة 90 - 95٪)، وبعد استخلاص الـ DNA من النطف التي أُخذت من جثة الضحية ومطابقته مع بصمة DNA جونز أثبت بأنه هو المجرم.

في هذه الجريمة تم استعمال مجسّ مفرد، وقد أثبت تطابق بصمة DNA النطف المأخوذة من جسم الضحية التي اعتدى عليها مع بصمة DNA جونز (المُشتبه رقم 1 في الشكل 7-10، في حين أثبت براءة المُشتبه رقم 2 لعدم التطابق). وعملياً تم استعمال 3 أو 4 مجسات مختلفة لإعطاء دليل قاطع لا يقبل الشك في إدانة المجرم.



شكل (7 - 10). فلم لأشعة X يظهر مقارنة لأنماط ناتجة بوساطة الترحيل الكهربائي لقطع مهضومة لتسلسل DNA بسيط

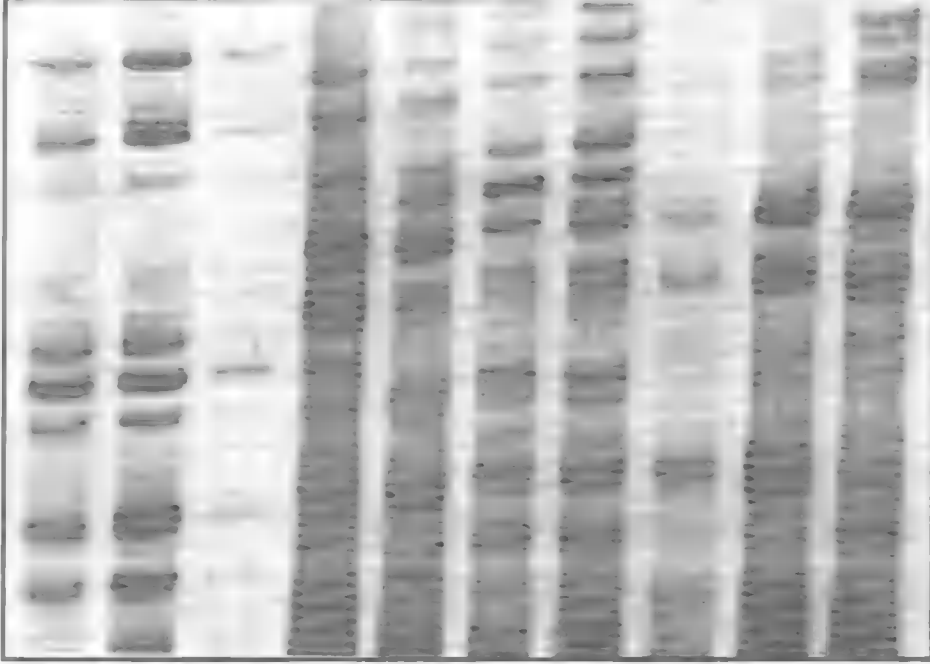
الـ DNA مأخوذة من الضحية المفتصة (المجال 2)، ومن نطف أخذت من الضحية (المجالين 3 و 4)، ومن شخصين مُشتبه بهما (المجالين 6 و 7). المجالين (1 و 5) يمثلان دليل حجمي لقياس الهجوم الجزئية لحزم الـ DNA. تم إظهار البرهان باستعمال مجس مشع مفرد، والذي يقترح بقوة بأن المشتبه به رقم 1 (المجال 6) هو المفتصب. عملياً تستعمل 3 أو 4 مجسات مختلفة لإعطاء تشخيص دقيق.

هذا ولم يقتصر استعمال المجسات متعددة المواقع في المجال الجنائي فقط، بل تعداه في كشف التلوث العرضي بالخلايا البشرية والحيوانية الحاصل في المزارع الخلوية أو النسيجية، إذ تم تطوير مدى من المجسات المعتمدة على التسلسلات المتكررة (Repetitive sequences) الموجودة في المملكة الحيوانية. فعند إجراء البصمة الوراثية نلاحظ بأن كل خط خلوي (Cell line) يمتلك بصمة DNA متفردة، إذ يقطع DNA الجينوم باستعمال الإنزيم القاطع *HinfI*، ومن ثم تُطبق وصمة سودرن التي تتضمن هنا التهجين مع مجسي جيفري 33.15 و 33.6 (بجهازان من شركة Cellmark^(*) Diagnostics) (شكل 7 - 11). ويمكن أن تُباع هذه المجسات مع أنظمة كشف غير

(*) عنوان الشركة :

Cellmark Diagnostic, Blacklands Way, Abingdon Business Park, Abingdon, Oxfordshire
OX14 1DY, UK. Tel.: 01235 528609, Fax: 01235 528141.

إشعاعية. كما يجري الآن تطوير أنظمة معتمدة على الكمبيوتر لتحليل بصمة الـ DNA، وهذه الأنظمة تُفيد في المقارنة بين المعلومات لعدد كبير من الصور الإشعاعية.



شكل (7 - 11). أنماط بصمة DNA نموذجية لخطوط خلوية تُلاحظ عند استعمال

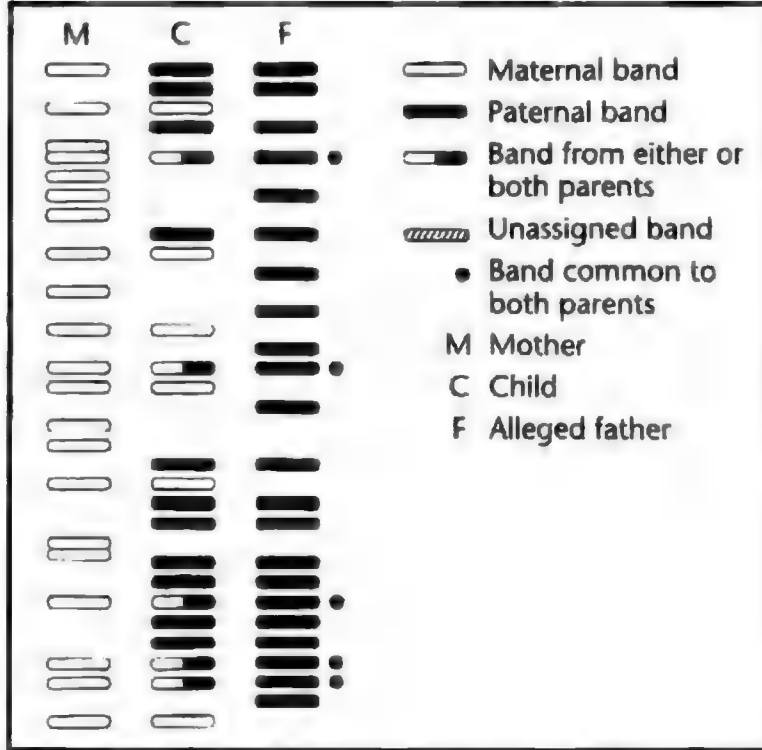
مجنس جيفري 33.15

ولتقريب الصورة للقارئ نضرب المثالين التاليين، على افتراض استعمال المجسّين متعددي المواقع، واللذان يتم استعمالهما بشكل شائع في كل من الحالات الاجتماعية والجنائية، والمُشتقان من مواقع التوابع الكروموسومية (Minisatellite loci) على الكروموسوم رقم 1 (وهو q^{24} - cen 1)، والكروموسوم رقم 7 ($q^{31.3}$).

إن هذين المجسّان استعملتا بشكل كبير، لأنهما يُعطيان بصمة DNA متفرّدة، وقد نجحنا في تحديد شرعية الأبوة في آلاف الحالات خلال السنوات الأخيرة.

أ. المثال الأول:

أدناه نتيجة بصمة الـ DNA للأم (M) والأب المشكوك فيه (F) والطفل (C) بعد استعمال المجسّين أعلاه (شكل 7 - 12). فهل هذه النتيجة تدل على أن الأب المشكوك فيه هو فعلاً أب لهذا الطفل أم لا ؟



شكل (7 - 12)

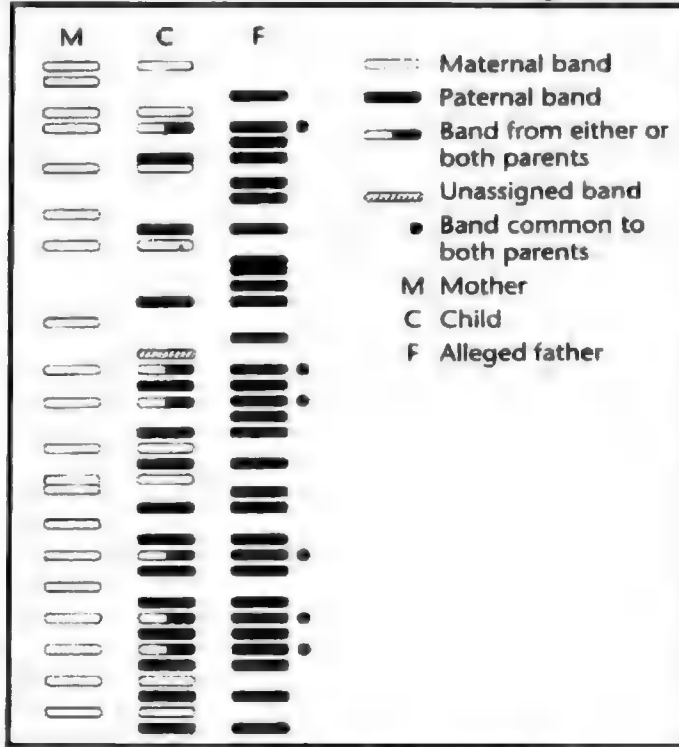
بصمة DNA لاختبار شرعية الأبوة

الحزم الفائحة (حزم الأم). الحزم الداكنة (حزم الأب). الحزم ذات النصف الفاتح والنصف الداكن (مشاركة بين الأبوين). الدوائر الداكنة (تشير إلى الحزم المشتركة بين الأبوين). وكما مبين في الشكل، فإن الطفل يمتلك حزم 6 أمومية (Maternal bands) و 11 حزمة أبوية (Paternal bands) و 5 حزم مشتركة بين الأم والأب غير الشرعي (Alleged father).

إن كل الحزم الموجودة عند الطفل هي آتية سواء من الأم أو الأب. بمعنى آخر إن كل حزم الطفل غير الأمومية موجودة في الأب. ولكون الأب والطفل يشتركان بـ 11 حزمة، والطفل لا يتميز بحزمة غير موجودة في أي من الأبوين، لذلك يمكن تأكيد الأبوة هنا. وفي الحقيقة فإن فرصة الرجل الذي تم اختباره على أنه ليس الأب هي بمرتبة 10^{-13} ، وهي قليلة جداً.

به المثال الثاني:

أدناه بصمة DNA للأم (M)، والأب غير الشرعي (F)، والطفل (C). بعد استعمال المجسجين سالفين الذكر (شكل 7 - 13). فهل هذه النتيجة تدل على أن الأب المشكوك فيه (الغير شرعي) هو فعلاً والد هذا الطفل أم لا ؟



شكل (7 - 13). بصمة DNA لاختبار شرعية الأبوة

الحزم الفاتحة (حزم الأم). الحزم الداكنة (حزم الأب). الحزم ذات النصف الفاتح والنصف الداكن (مشتركة بين الأبوين). الحزمة المخططة (حزمة غير مؤشرة لا في الأب ولا في الأم، أي يتفرد بها الطفل فقط). الدوائر الداكنة (تشير إلى الحزم المشتركة بين الأبوين).

في هذه الحالة يمتلك الطفل 8 حزم أمومية، و 15 حزمة أبوية، وحزمة واحدة غير موجودة في كل من الأبوين. وبسبب وجود هذه الحزمة التي يتفرد بها الطفل، فإن أماننا احتماليين: الأول، هو أن ظهور هذه الحزمة كان بسبب طفرة وراثية. والثاني، بأن الرجل الذي تم فحصه هو ليس أباً لهذا الطفل. وضمن تقديرات الاحتمالية للأبوة فإنه يمكن تحديد عدد متوسط الحزم الظاهرة (n) وكذلك احتمالية معدل (x) كون الحزمة في فرد A تطابق حزمة في فرد ثاني B غير ذي علاقة. وفي تلك الحالة لكون الطفل والأب يشتركان في 15 حزمة، فإن احتمالية كون الرجل الذي تم فحصه بأنه ليس الأب تكون قليلة جداً (الاحتمالية = 10^{-7} أو أقل). وعليه فإن الاستنتاج الأكثر قبولاً بأن ظهور الحزمة المتفردة في الطفل هو ناتج عن طفرة. وفي الحقيقة فإنه في كل 1419 حالة لفحص الأبوة بواسطة مجسات التتابع (Minisatellite probes) الواقعة على الكروموسومين 1 و 7، يُلاحظ حزم طافرة مفردة (Single-mutant bands) في الأطفال بحدود 399 حالة، والتي تُشكل 28% من كل الحالات.

الفصل الثامن

مصادر الـDNA وإجراء

البصمة الجينية

الفصل الثامن

مصادر الـ DNA وإجراء البصمة الجينية

اكتشاف بصمة الـ DNA:

منذ الفترة التي واكبت عصر الثورة العلمية والمحاولات البشرية مستمرة للوصول إلى أدلة حيوية ومفيدة في تحديد أو تشخيص علامات مُعيّنة يتفرّد بها أشخاص أو شخص مُعيّن (وحتى الحيوانات) دون الغير، للاستفادة منها في مجالات تطبيقية، طبية أو جنائية أو غيرها. فقد كان مثلاً لاكتشاف الخطوط الجلدية (Dermal ridges) في عام 1882 من قبل السير فرانسيس غالتون (Sir Francis Galton) (شكل 8 - 1)، الأثر البالغ في تعزيز الأدلة الجنائية المعتمدة على بصمات الأصابع المتروكة على الأسطح الملساء لمسرح الجريمة. ومنذ ذلك الحين، حاول الكثير من الباحثين التوصل إلى علامات مهمة أخرى للتمييز بين الأشخاص، تمثلت بالاعتماد على فصائل الدم لنظام الدم ABO وبروتينات المصل والنظائر الإنزيمية (Iso-enzymes) لكريات الدم الحمراء بعد ترحيلها كهربائياً (شكل 8 - 2). وطبقاً لذلك يُمكن استثناء نسبة لا بأس بها من المُشتبه بهم، وذلك لأن بعض الاختلافات الفردية قد لا تُكتشف على مستوى الأدلة أعلاه، الأمر الذي يترك مجالاً للشك في حقيقة العينة تحت الدراسة، والتي قد تكون لشخص آخر.



شكل (8 - 1). فرانسيس غالتون (1822 - 1911) مؤسس دراسة علم الخطوط الجلدية

Species	Lactic dehydrogenase (LDH)	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)	Nucleoside phosphorylase (NP)
Human			
African Green Monkey			
Chinese Hamster			
Mouse			
Rat			
Syrian Hamster			

شكل (8 - 2). مخطط هلام النشا العمودي (Vertical starch gel) يوضح الأنماط التي يمكن الحصول عليها للنظائر الإنزيمية لثلاثة إنزيمات وهي LDH ، G6PDH ، NP من كائنات حيوانية مختلفة

لقد قُدِّرَ بأن البشر يتباينون بما يُقارب $\frac{1}{500} - \frac{1}{800}$ زوج قاعدي، لذلك فإنه بحدود 10 مليون تباين قد يتواجد بين 3 بليون زوج قاعدي مُكوّن لجينوم الإنسان. وعليه فإن هنالك فقط 100 أو ما يُقارب ذلك من التباينات في مجاميع الدم وفي نمط الترحيل الكهربائي للبروتينات، وعند الاعتماد على تلك التباينات يمكن فقط تحديد نسبة بسيطة جداً من تغيرات الـ DNA التابع لنا. لذلك فقد تمّ تطوير تقنيات جزيئية جديدة خلال الـ 20 سنة الماضية لكي تُمكن من تشخيص الآلاف من التّوَعّات على مستوى الـ DNA.

وفي عام 1985 / 1986 تمكّن العالم جيفري (Alec Jeffreys) (شكل 8 - 3) من اكتشاف بصمة الـ DNA بالصدفة عندما كان يدرس مناطق التغير المُفرط (Hypervariable regions) للجينات المسؤولة عن إنتاج الميوغلوبين (البروتين الذي يحمل الأوكسجين في الأنسجة العضلية)، إذ أصبح جيفري بعد هذا الاكتشاف، وهو لا يزال في سن الثامنة والثلاثين، زميلاً للجمعية الملكية البريطانية، ونال درجة الأستاذية من جامعة لسيستر في بريطانيا. وقد تمكّن من حل مشكلة أحد الأطفال، والذي حاولت والدته التي تحمل الجنسية الغانية إلحاقه بها إلى بريطانيا، ولكن السلطات البريطانية منعت بحجة أنه ليس ابنها، إذ استطاع جيفري إثبات أمومة المرأة الغانية للطفل اعتماداً على بصمة الـ DNA، وبالفعل ألحق الطفل بعد ذلك بأمّه.



شكل (8 - 3). العالم جيفري مُكتشف بصمة الـ DNA

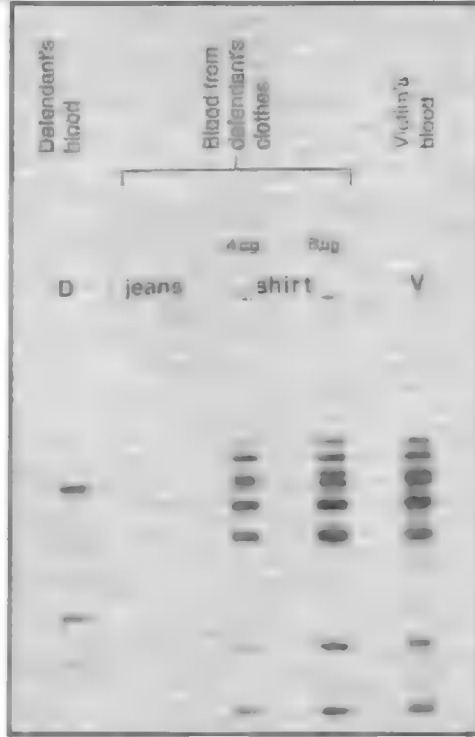
وطالما أن هذه التقنية يمكن أن تكون منافساً حقيقياً للأدلة المستقاة من بصمات الأصابع التقليدية، فقد أطلق عليها بصمة الـDNA، ويُطلق عليها أحياناً نمط أو تنميط الـDNA (DNA typing).

يتطابق جميع بني البشر في جينوم الخلية الواحدة بنسبة كبيرة جداً تتجاوز 90٪، ويختلفون بنسبة قليلة، ورغم قلة هذه النسبة، فإنها تُشكّل الجوهر الذي تعتمد عليه بصمة الـDNA. وإذا علمنا أن عدد أزواج القواعد النيتروجينية في الخلية الواحدة يقارب 3 مليار، فإن عدد الأزواج القاعدية التي تُشكّل النسبة القليلة الباقية تدرج في تسلسلات معينة غير فعالة أو غير مُشفرة.

إن اختلاف نسبة وجود التكرارات المترددة (Tandem repeats) في هذه التسلسلات من فرد لآخر (باستثناء التوائم الصنوية) يُعدّ الأساس الذي يُعتمد عليه في التفريق من شخص لآخر بكفاءة عالية، إذ تورث هذه الأنماط المختلفة من التسلسلات بصورة ثابتة من الآباء إلى الأبناء والأحفاد طبقاً لقوانين مندل الوراثة. مع العلم بأن هذا التنوع يمكن أن يكون في موقع واحد من الكروموسوم أو مواقع متعدّدة ضمن الكروموسوم الواحد أو الكروموسومات الأخرى، ويُشار إلى الاختلافات في تسلسل جزء محدد من الـDNA بين فرد وآخر بالأليلات Alleles (صور الجينات).

المصادر المهمة للحصول على الـDNA في التطبيقات الجنائية:

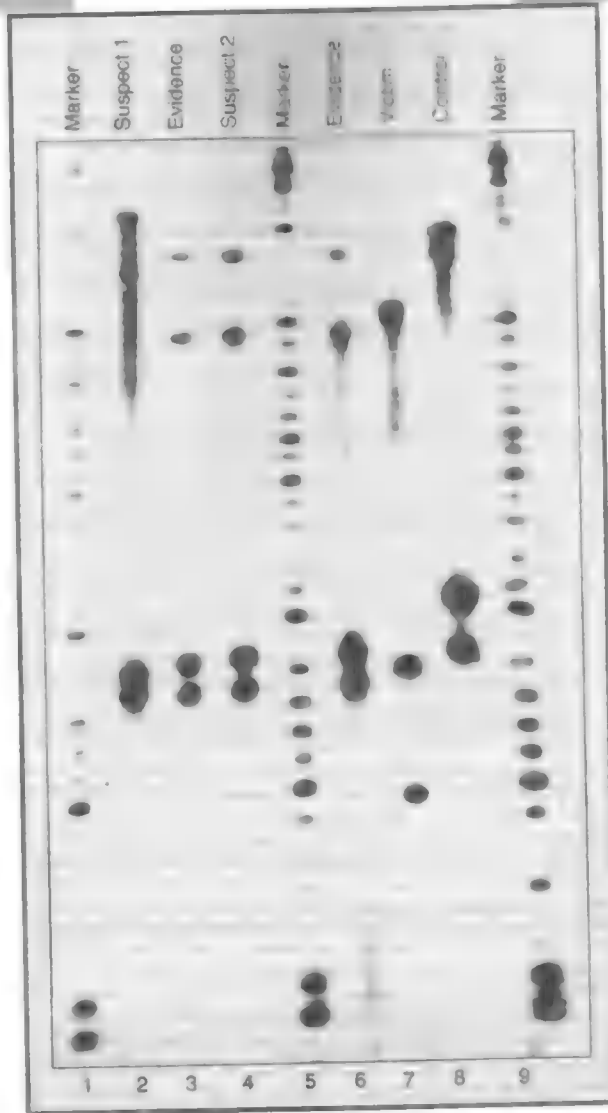
1. الدم (Blood): يُعدّ الدم من المصادر الممتازة للحصول على DNA الإنسان، إذ يتواجد الـDNA في خلايا الدم البيضاء، ولكن ليس في كريات الدم الحمراء (الفاقة للنواة)، فحجم بسيط لبقعة دم يُقارب 50 مايكروليتر يكون كافياً لإجراء تحليل VNTR نموذجي، (شكل 8 - 4).



شكل (8 - 4). بصمة DNA مُحضَّرة من بقع الدم

بصمة الـ DNA لبقعة دم وُجدت على ملابس المُتهم (بنطلون جينز وقميص) تطابقت مع بصمة DNA الضحية. وهذا يدل على أن دم الضحية قد لُطِّخَ ملابس المجرم، مما يُرجِّح كون المُتهم كان في مسرح الجريمة.

2. الحيوانات المنوية (Sperms): إن الـ DNA المُستخلص من رؤوس الحيوانات المنوية (النُطف) يُعدُّ أهم مصادر أدلة الـ DNA في حالات الاعتداء الجنسي. إذ تحتوي خمسة مايكروليترات من السائل المنوي (Semen) على كمية من الـ DNA بما يُقارب 50 مايكروليتر من الدم. تُستعمل طريقة استخلاص خاصة لتحرير الـ DNA من رؤوس النُطف، وبناءً على ذلك فإن استخلاص الـ DNA من عينات الاعتداء الجنسي يتم بطريقة مختلفة، إذ يكون ناتج الاستخلاص الأول بشكلٍ أساسي للـ DNA من الخلايا الطلائية (Epithelial cells) للضحية، وناتج الاستخلاص الثاني بشكلٍ أساسي للـ DNA من السائل المنوي للمُعتدي، (شكل 8 - 5).



شكل (8 - 5). بصمة DNA لحالة اغتصاب

المجال 3 دليل من مسحة مهبلية للضحية. المجال 6 لطخة سائل منوي من ملابس الضحية. بالإمكان استبعاد المشتبه به رقم 1 لأن نمط الحزم لا يتطابق. أما المشتبه به رقم 2 فلا يمكن استبعاده، لأن نمط الـ DNA الخاص به (المجال 4) يُطابق نمط الـ DNA الموجود في عينات الدليل (المجالين 3 و 6).

3. اللُّعاب (Saliva): يحتوي اللعاب على عينة خلوية لبطانة الفم، إذ يمكن استخلاص الـ DNA من مكانات العض أو القضم وأعقاب السجائر ومن الطوابع

البريدية الموضوعة على أطراف الرسائل المُلصقة لتلك الأطراف. وفي حقيقة الأمر تحمل الرسائل المتفجرة التي لا تنفجر أدلة يمكن أن تُفيد في التعرف على المجرمين.

4. بُصيلات الشعر (Hair follicles): تحتوي البُصيلة الواقعة في قاعدة الشعرة على خلايا غنية بالـ DNA. ولاستعمال ذلك في تحليلات الـ DNA الجنائية، فإن الشعر لا بُدَّ أن يكون مسحوباً من الجسم، إذ إن الشعر المتكسر لا يُمكن أن يكون ذو فائدة في هذا المجال، إلا إذا كان طول محور الشعرة لا يقل عن 1 - 2 سم للاستفادة من المايتوكوندريا القليلة الموجودة في المحور واستعمالها في دراسة تحليل تسلسل DNA المايتوكوندريا.

5. أنسجة الجسم (Body tissues): إن أي نسيج جسمي لم يزل بصورة غير مُتحللة يُعد مصدراً جيداً للـ DNA.

6. العظام (Bones): تُعد العظام واحدة من أفضل المصادر للـ DNA المُستخلص من جثث الإنسان المُتحللة. وحتى بعد تحلل اللحم، فإنه يمكن في الغالب الحصول على الـ DNA من العظم فاقد الأملاح. لقد استعمل الـ DNA من العظام لتمييز عظام الأسرى للجنود الفيتناميين وجثث الروس البيض لعائلة (رومانوف) الذين أعدموا خلال الثورة البلشفية.

7. الأسنان (Teeth): كما هو الحال في العظام، فإن الأسنان يمكن أن تكون مصدراً ممتازاً للـ DNA وخصوصاً بعد فترة طويلة من تحلل الجسم.

8. البول (Urine): إن البول بحدِّ ذاته لا يحتوي على DNA، ولكن من الممكن أن يحتوي على خلايا طَلائية، والتي تحتوي على الـ DNA، مع العلم أن أغلب الأشخاص الأصحاء لا يحتوي بولهم على خلايا طَلائية.

بعض الملاحظات والخطوات الأساسية حول استخلاص وحفظ الـ DNA من العينات المتوفرة في مسرح الجريمة:

قبل الإشارة إلى الملاحظات والخطوات الأساسية والمهمة عند التعامل مع العينات، لا بُدَّ من التنويه إلى معادلتين مهمتين، الأولى تتعلق بحساب تركيز الـ DNA المُستخلص، وهي:

Concentration of DNA μgml^{-1} = Absorbance at 260 nm \times dilution factor \times 50

أو تُكتب بأسلوب مُبسّط:

$$(\text{O.D. } 260 \text{ nm}) \times (\text{Dilution factor}) \times (50 \mu\text{g/ml}) = \mu\text{g/ml}$$

إذ توضع عينة الـ DNA داخل أنبوبة زجاجية كوارتز خاصة في جهاز قياس الامتصاصية (مطياف U.V ضوئي)، ويُثبت الطول الموجي عند 260 نانوميتر، ويتم ملاحظة قراءة الجهاز. إذ إن كل قيمة 1 عند هذا الطول الموجي تُكافئ 50 مايكروغرام من شريط الـ DNA المزدوج لكل مل. وعليه يتم ضرب قراءة الجهاز \times معامل التخفيف لعينة الـ DNA \times 50 (ثابت)، وعندها يكون الناتج مُقدراً بالمايكروغرام / مل.

أما المعادلة الثانية، فتستعمل لتقدير نقاوة الـ DNA المُستخلص من العينة، وهي:

$$\text{Purity of DNA (نقاوة الـ DNA)} = \frac{\text{O.D. } 260 \text{ nm}}{\text{O.D. } 280 \text{ nm}} = \text{or} > 1.8$$

أي تُحسب امتصاصية عينة DNA عند الطول الموجي 260 نانوميتر، ثم تُحسب الامتصاصية للعينة نفسها عند الطول الموجي 280 نانوميتر، وبعد قسمة الامتصاصية الأولى على الثانية، يجب أن يكون الناتج ليس أقل من 1.8، فإذا كان أقل، فإن ذلك يعني أن العينة غير نقية وتحتاج إلى تنقية أو إعادة استخلاص.

هذا مع العلم بأنه توجد وسائل أخرى تستعمل في هذا المجال، وقد يستطيع الباحث المُتمرس من ملاحظة تركيز ونقاوة الـ DNA بعد ترحيل عينة منه على هلام الأجاروز.

ورغم الأهمية التطبيقية للمعادلتين سالفتي الذكر، إلا أن وجود RNA مع الـ DNA قد يُعطي نتائج خاطئة أو غير دقيقة، إذ من الممكن أن يتواجد الـ RNA وخصوصاً إذا كانت طريقة الاستخلاص للـ DNA لا تتضمن استعمال الإنزيم الهاضم للـ RNA وهو RNase. لذلك من الممكن اللجوء إلى وسائل أخرى:

أ. استعمال صبغات تُكوّن معقد بَرّاق (Fluorescent complex) عند اندماجها مع الـ DNA، مثل: DABA ، Hoechst 33258 ، DAPI10 ، Ethidium Bromide.

ب. التهجين مع محس معلوم الكثافة وبوجود سيطرة سالبة.

وفيا يتعلّق بالفقرة (أ) تتم الطريقة كما يأتي:

1. تحضير هلام أجاروز بتركيز 0.5%.
 2. تُحمّل إحدى حفر الهلام بدليل حجمي، مثل DNA الفايروس لامدا (λ) المقطوع بإنزيم *HindIII* أو إنزيم قاطع آخر بحيث تكون القطع الناتجة معلومة الحجم الجزئي. وتحمّل حفرة أخرى بـ DNA قياسي معلوم التركيز وغير مُقطع. هذا فضلاً عن حفرة أخرى توضع فيها العينة تحت الاختبار.
 3. يتم إجراء الترحيل الكهربائي للعينات الثلاث لمدة 1 - 2 ساعة (الفولتية = 5 فولت).
 4. يُصبغ الهلام ببروميد الإيثيديوم.
 5. يُفحص الهلام فوق جهاز الـ UV transilluminator عند الطول الموجي 302 نانومتر، ثم يُصوّر وتُجرى عملية المقارنة.
- وبشكل عام كلما كانت حُزم الـ DNA أكثر وضوحاً وذات حواف حادة ومُتميزة، دلّ ذلك على نقاوة جيدة.

تنقية الـ DNA:

إن نقاوة الـ DNA تعتمد بشكل أساسي على الطريقة المستعملة في الاستخلاص وطبيعة العينة المُنتقة، ومع ذلك فقد طوّرت طرق عديدة وحديثة للتنقية، ولكن بشكل عام يمكن الاستفادة من الخطوات الآتية:

1. يجب التخلص من البروتينات الخلوية باستعمال إنزيم Proteinase.
2. المعاملة بالـ Sodium perchlorate.
3. المعاملة بالفينول.
4. إجراء الطرد المركزي للعزل.
5. المعاملة بالفينول / كلوروفورم.

6. المعاملة بالكلوروفورم.
7. إجراء الفرز الغشائي (الدليزة) بوجود دارئ TE، أو الترسيب بالإيثانول المطلق المبرّد.

وللحصول على DNA شديد النقاوة:

8. إجراء الطرد المركزي بوجود كلوريد السيزيوم.
 9. تركيز الـ DNA بإضافة PEG.
- ملاحظة: إن عينات الـ DNA المحفوظة يجب أن تكون بحجم جزئني أكبر من الحجم الجزئني لقطع الـ DNA المطلوب دراستها (وبشكل عام يُفضّل أن تكون أكبر من 10 - 20 كيلو زوج قاعدي).

التعامل مع العينات الإيجابية:

أ. الدم (Blood):

1. التخلص من كريات الدم الحمراء بواسطة تحليلها وترك الخلايا الأخرى أو أنويتها (خلايا الدم البيضاء) لاستخلاص الـ DNA، مع ضرورة إزالة الحديد الناجم عن تكثر كريات الدم الحمراء، لأنه يُسبّب تحطّم الـ DNA.
 2. امزج مع 4 أحجام من دارئ التحليل (Lysis buffer).
 3. رَسَب بالطرد المركزي، وتابع أدناه:
- إذا كانت العينة بقعة دم (Blood stain) يتم ما يأتي:
- اغمس الجزء الحاوي على البقعة لمدة طول الليل عند درجة 4°م في دارئ التحليل.
4. أعد الاستخلاص باستعمال دارئ لتحليل الأنوية (يحتوي على HCl ، NaCl ، DTA ، pH = 7.4).
 5. أضف إنزيم Proteinase K.
 6. عامل بالـ SDS.
 7. احضن لمدة 2 ساعة عند 65°م. وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

ب. السائل المنوي (Semen):

تُعدّ النطف أكثر مقاومة للتحلل مقارنةً ببقية الخلايا.

1. تؤخذ مسحة مهبلية وتُعامل بالمحلول الفسيولوجي (Normal saline).
2. إجراء الترسيب. وتابع أدناه:

إذا كانت العينة بقعة لسائل منوي (Semen stain)، يتم ما يأتي:

1. قطع الجزء الحاوي على البقعة إلى أجزاء صغيرة، ثم تنقع مع التحريك المستمر (عند درجة 4°م) في محلول PBS + Sarcosyl، ثم يُجرى الطرد المركزي.
3. للتخلص من التلوث الناجم عن وجود خلايا تعود للمرأة، يجب إعادة تعليق الراسب في Proteinase K + SDS + PBS واحضن عند درجة حرارة 65°م.
4. أعد الاستخلاص (لتحليل رؤوس النطف) في مكونات النقطة (3) أعلاه نفسها + EDTA + DTT، ثم احضن عند درجة حرارة 65°م. وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

ج. الأنسجة الرخوة (Soft tissues):

سواء كانت طرية حديثة أو مُتحللة (Fresh or decomposed):

1. قطع إلى قطع أصغر بوساطة مقص نظيف.
2. ضع القطع في المحلول الفسيولوجي وجانس باستعمال مجانس الأنسجة (Tissue homogenizer) عند درجة 4°م.
3. اجمع بوساطة الطرد المركزي. وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

د. الأنسجة المجمدة (Frozen tissue):

1. كسر بوساطة هاون.
2. أطحن بوساطة خلاط (بوجود النيتروجين السائل).
3. ضع المسحوق في دارئ التحلل.
4. أضف SDS + Proteinase وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

هـ. العظام (Bones) نخاع العظم والمادة البينية (Marrow and matrix):

بالنسبة للنخاع يتم:

1. فتح العظم ميكانيكياً.
 2. يُقشط جزء من النخاع.
 3. يُضاف الدارئ المُحلَّل ويُبَاشَر بطرق الاستخلاص الروتينية.
- أما المادة البينية الصلبة فيتم:

1. قطع إلى قطع صغيرة.
2. امزج باستعمال الخلّاط بوجود النيتروجين السائل.
3. جانسه باستعمال المُجانس إلى مسحوق.
4. حلّ باستعمال دارئ التحليل، وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

و. العينات المحفوظة بالفورمالين (Formalin samples):

وهي عينات غالباً ما يكون فيها تحاشي تحلّل الـ DNA صعباً.

1. اغسل النسيج بالمحلول الفسيولوجي.
2. قطع إلى قطع صغيرة.
3. جانس بمجانس في المحلول الفسيولوجي المُبرّد.
4. رتب وأعد الاستخلاص بدارئ التحليل.
5. أضف SDS + Proteinase، وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

ز. الأنسجة لمطوّرة بالبرافين (Paraffin-embedded tissues):

وهذه أيضاً عينات غالباً ما يكون تحاشي تحلّل الـ DNA فيها صعباً.

1. أزل البرافين الزائد.
2. قطع إلى شرائح صغيرة بوساطة شفرة حادة.
3. اغسل بالزايلين ثم بالإيثانول.

4. أعد الاستخلاص بدارئ التحليل.

5. أضف SDS + Proteinase، وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

أنواع العينات (Types of samples):

هنالك نوعين من العينات التي يمكن أن تؤخذ من الأشخاص المشتركين في الحدث الجرمي، هما:

1. عينات مسرح الجريمة (Crime scene):

أو عينات الإثبات أو الدليل الطبي (Medical evidence)، والتي تؤخذ من شخص، أو قد تربط هذا الشخص مع آخر أو مع مسرح الجريمة. ومن الأمثلة على ذلك، تلك التي تتضمن مسحات مهبلية تحتوي على سائل منوي يؤخذ من الضحية المقتبصة، أو بقايا دم تؤخذ كمسحات من المجرم بعد وقوع الجريمة.

2. عينات مرجعية (Reference samples):

وهي تلك العينات التي يتم معها مختبرياً مقارنة العينات المأخوذة من مسرح الجريمة لتحديد المشتبه به أو الضحية. إن أغلب العينات المرجعية الشائعة المستعملة هي مسحات من الفم أو عينات دم لإجراء تحليل الـ DNA. يجب أن تُحفظ كل من عينات الإثبات الطبية أو المرجعية دائماً مفصولة، لتقليل احتمالية التلوث الاختلاطي (Cross-contamination).

وبالنسبة للحاويات والمعدات المستعملة لجمع العينات، فإنها تتباين حسب مختبر التحليل، ولكنها في العادة تتضمن الآتي:

1. توضع عينات الدم في أنبوبة EDTA للـ DNA المرجعي (شكل 8 - 6).

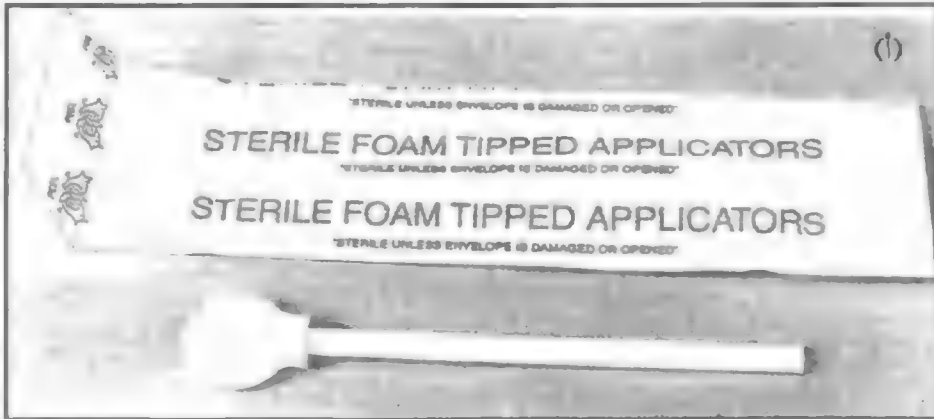
2. تستعمل مسحات الفم وورق FTA للـ DNA المرجعي (شكل 8 - 7).

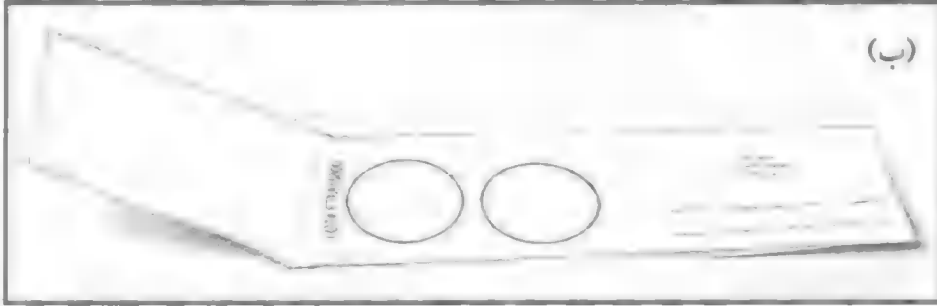
3. يوضع الدم غير المتخثر (غير المتجلط) في أنبوبة Potassium oxalate و Sodium fluoride لأغراض الكحول والعقاقير الأخرى.

4. يوضع البول في حاوية معقمة لأغراض تحليل العقاقير.
5. تستعمل مسحات الصوف القطني الجافة كمسحات دليل.
6. تستعمل المحفظات والحقائب البلاستيكية طرفية الغلق (Plastic clip seal bags) للشعر والألياف والمواد البيولوجية مثل الأوراق من الملابس والأجسام الغريبة من الجروح ... الخ.
7. تستعمل الحقائب أو المحفظات الورقية (Paper bags) للملابس الجافة.



شكل (8 - 6). أنبوبة EDTA لجمع الدم لأغراض تحليل الـ DNA





شكل (8 - 7). عِدّة أخذ مسحة من الفم لأغراض جمع الـ DNA (أ)، وورق FTA لجمع الـ DNA (ب)

هذا ولا بُدّ من تعليم (تأشير) العينة بالمعلومات الآتية:

1. اسم الشخص.
 2. تاريخ ولادة الشخص.
 3. اسم الطبيب.
 4. تاريخ ووقت أخذ العينة.
 5. منطقة العينة.
- ويجب أن تُحفظ العينات في محفظات محكمة الغلق أو عُدد للنقل (شكل 8 - 8).



شكل (8 - 8). مكونات عِدّة أخذ الـ DNA مع المحفظات محكمة الغلق

جمع العينات:

يُبين الجدول (8 - 1) القيمة الإثباتية للعينات التي قد تؤخذ بعد الاعتداءات الجنسية، والتي يمكن الاعتماد عليها في اختبارات تحليل الـ DNA بالنسبة للضحية أو الشخص المشتبه به.

جدول (8 - 1). القيمة الإثباتية للعينات المأخوذة بعد الاعتداءات الجنسية

نوع العينة	العدة المستعملة	القيمة الإثباتية
العينات المأخوذة من الضحية		
مسحة من فوهة الرحم أو أعلى المهبل أو أسفل المهبل أو فرج المهبل	مسحة جافة وشريحة زجاجية	التعرف على النطف والـ DNA من سوائل الجسم التي تعود للمعتدي
مسحة من حول المخرج أو من المستقيم	مسحة جافة وشريحة زجاجية	التعرف على النطف والـ DNA من سوائل الجسم التي تعود للمعتدي
مسحة من العضة	مسحات رطبة وجافة	خلايا من الفم لإجراء تحليل الـ DNA
قطع أظفريّة، قشوطات مسحات من الأظافر	أوقاطعة أظافر أو مقص أو عود خشب البرتقال أو عود تنظيف الأسنان	إجراء تحليل الـ DNA من المشتبه به، هذا إذا قامت الضحية بخريشة وتحديث المجرم
شعر العانة	مشط وصوف قطني	الشعر المتساقط والألياف من المشتبه به
الدم والبول	حاوية الـ Fluoride oxalate حاوية جمع العينات العادية	أو العقاقير المستعملة لتسهيل الاعتداء الجنسي
الملابس	حقيبة ورقية	السائل المنوي، الشعر، الألياف، الدم من المشتبه به أو مسرح الجريمة
المواد الساقطة القريبة الضحية	من غلاف ورقي نظيف	مواد بيولوجية، شعر، ألياف، قد تساعد في التعرف على المشتبه به أو مسرح الجريمة

نوع العينة	العدة المستعملة	القيمة الإثباتية
مسحة دم أو فم	أنبوبة EDTA للدم أو مسحة عينة مرجعية لـ DNA الضحية أو ورق FTA	
العينات المأخوذة من المشتبه به		
مسحات من قاعدة ومخبر مسحة جافة	خلايا مخاطية (Mucosal cells) من المهبل أو المستقيم تعود للضحية	
قطع أظفريّة، قشوطات أو قاطعة أظافر أو مقص أو عود خشب البرتقال أو عود تنظيف للأسنان	خلايا من المهبل أو المستقيم تعود للضحية إذا قام المجرم بإدخال أصابعه في هذه الأماكن	
مسحة من العضة	مسحات رطبة وجافة	لعاب مع خلايا من الفم من الشخص المعروض لتحليل الـ DNA، هذا فيما إذا قامت الضحية بعضن المجرم
الدم	أنبوبة EDTA أو مسحة أو عينة مرجعية لـ DNA المشتبه به ورق FTA	
الملابس	حقيبة ورقية	دم، شعر، ألياف تعود للضحية أو مسرح الجريمة

تحديد الجنس (Sex determination):

إن وجود السلاسل المتكررة المتميّزة الواقعة على كروموسوم Y يمكن أن تساعد في معرفة الـ DNA الذي يُتميّر الأفراد الذكور، إذ يتم كلونة (استنسال) هذه السلاسل المتكررة واستعمالها لتحديد الجنس، والاستفادة منها للأغراض الجنائية أو الطبية.

إذ يتم تقطيع الـ DNA مع إنزيم قاطع مناسب، ثم يُهجن مع مجس (تتوفر حالياً ثلاثة مجسات في المختبرات تؤدي الغرض نفسه)، بحيث تتكوّن حزمة تهجين موجبة تدلّ على الجنس المذكور.

إن حدوث انتقال (Translocation) بين كروموسوم X والذراع الطويل لكروموسوم Y قد يؤدي إلى التشويش في النتائج، ولكن ولحسن الحظ فإن حدوث مثل هذه الحالة قليل جداً.

يُحدد الجنس أيضاً باعتماد تنميط الـ Amelogenin، إذ أن أليله المحمول على كروموسوم X يكون بحدود 103 قاعدة، أما أليله المحمول على كروموسوم Y فهو بحدود 109 قاعدة. وعليه فإن العينة الذكورية تُظهر كل من قطعتي الـ X و Y. في حين أن العينة الأنثوية تُظهر فقط قطعة X.

بعض الأسباب التي تؤدي إلى تحطّم أو ظهور نتائج خاطئة للـ DNA المستعمل في دراسة البصمة الجينية:

عند التداول مع العينات، لا بُدّ من تقليل التحطّم أو التداخل الذي من الممكن أن يحدث للـ DNA بسبب عدد من العوامل، منها:

1. الإنزيمات القاطعة:

الناجمة عن التلوث الميكروبي، إذ يمكن أن يحدث هذا التحطيم بصورتين، الأولى تتمثل بتكسّر أو هضم الـ DNA من الأطراف (End degradation) والذي يحدث بفعل الإنزيمات القاطعة الخارجية (Exonucleases). والثانية تتمثل بتقطيع الـ DNA من الداخل في الشريط المزدوج للـ DNA (Double strand break) بفعل الإنزيمات القاطعة الداخلية (Endonucleases).

2. تلوث بالتربة (Soil contamination):

والذي يؤدي إلى إمكانية استخلاص DNA كروموسومي أو بلازميدي تابع للبكتيريا المتواجدة في التربة وليس للعينة، ومن ثمّ تداخله مع نتائج DNA العينة المطلوبة.

3. تحطّم في الـ DNA بفعل عوامل بيئية:

مثل أشعة الشمس ودرجة الحرارة والرطوبة وغيرها. وبشكل عام فإن قطع الـ DNA الكبيرة تُعدّ هدفاً سهلاً للتحطّم مقارنةً بالقطع الصغيرة.

4. تلوث وتحطّم ناجم عن سوء التعامل مع العينة بفعل عدم الكفاءة الفنية للشخص القائم بعملية العزل والاستخلاص والتنقية.

ملاحظة: إذا وُجدت العينة أو الدليل الجنائي على قطع السكراب والحقائب البلاستيكية والمواد الصناعية، فإنها تُعدّ مناسبة. أما إذا وُجدت على السجاد فإنها غير مناسبة لحذّاء، وذلك لإمكانية حدوث التلوث الميكروبي بالبكتيريا.

حفظ الأدلة الجنائية Preservation of forensic evidence

أ. حفظ الدم:

يُحفظ الدم بالـ Citrate أو الـ EDTA (الهيارين أقل استعمالاً) في أنبوبة اختبار لأيام بدرجة حرارة الغرفة، وإذا أُريد حفظه لسنوات، فإنه يُحفظ بدرجة حرارة 4°م بالتجميد، ولكن دون إذابة. أو تُحَقِّف العينة السائلة في الهواء على ورق ترشيح، وتوضع داخل مُغْلَف بلاستيك لحفظها وحمايتها من الرطوبة، وتُخزّن بدرجة حرارة 4°م أو -20°م.

ب. حفظ الأنسجة:

يُنَبَت النسيج ثم يُغسل بالمحلول الفسيولوجي ثم يُحفظ مُبرّداً أو مُجمّداً.

تضخيم الـ DNA باستخدام تقنية الـ PCR:

إن كل من تقنية RFLP و VNTR المُهمّتين في عدد من التطبيقات تعتمد بشكل أساسي على وصمة سودرن وطريقة الكلونة، ولكن هاتين الأخيرتين تُعدّان محدودتين، إذ تحتاج الكلونة إلى وقت وتتطلّب أسبوعاً أو أكثر من الوقت المخبري، فضلاً عن ذلك تتطلّب وصمة سودرن إلى كميات كبيرة نسبياً من الـ DNA تصل بشكل عام إلى ميكروغرامات (يصل حجم الدم المسحوب مباشرة إلى 1 مل)، لذلك طُوّرت تقنية جيّدة لمضاعفة نسخ الـ DNA سُمّيت PCR. تعتمد الـ PCR على وسائل صناعية لمضاعفة تسلسل مُعيّن من الـ DNA (أجزاء من الـ Kb أو أقل) بشكل سريع، لذلك تتكوّن ملايين النسخ من هذه السلاسل في فترة قياسية. ويمكن تلخيص هذه الطريقة (راجع الفصل السادس) بالخطوات الآتية:

1. توفر بادئين (Two primers) كل منهما يتألف من 15 - 20 قاعدة من الـ DNA، وهذه التسلسلات القصيرة تسمى بالنيوكليوتيدات المحدودة (Oligonucleotides) بحيث تُطابق هذه البوادي تسلسلات الـ DNA المجاورة للتسلسل المراد إكثاره، والذي من الممكن أن يحتوي على توابع كروموسومية. إن هذه البوادي تُصنع في مؤسسات مختبرية خاصة.

2. إنزيم بلمرة الـ DNA (Taq polymerase) مستقر حرارياً مُستخلص من بكتريا *Thermus aquaticus* (المُحملة للحرارة، والتي تعيش في الفوارات الساخنة)، والذي يعمل على مضاعفة الـ DNA، إذ تبدأ استطالة البادئ (Primer extension).

3. عدد كبير من نيوكليوتيدات الـ DNA الحرة.

4. الـ DNA الجينومي للفرد المطلوب. وبسبب دقة الـ PCR يمكن اعتماد كمية DNA قليلة للبدء بإكثارها (تتراوح بشكل عام من 10 - 50 نانوغرام).

يُسَخَّن الـ DNA الجينومي في بداية الأمر إلى درجة حرارة عالية نسبياً (بحدود 90 درجة مئوية)، لذلك يُمسَخ ويصبح أشرطة مفردة، ثم يُعَرَّض لكميات كبيرة من البوادي التي تتجهجن معه (تتزوج قاعدياً) مع القواعد المُكملة في الـ DNA الجينومي، ثم يُبَرَّد للسماح لعملية التهجين (بحدود 35 - 65 درجة مئوية)، ويُسَخَّن الـ DNA بعد ذلك إلى درجة حرارة وسطية (بحدود 70 - 75 درجة مئوية)، وبوجود عدد كبير من القواعد الحرة، إذ يتم تصنيع شريط جديد من الـ DNA بفعل الإنزيم، ويستمر بإضافة القواعد ابتداءً من البوادي. إن الشريط الجديد المُصنَّع يتكوّن من مزدوج يمتلك نهاية 5' للبادئ عند إحدى النهايات، يعقب ذلك القواعد المُضافة خلال استطالة البادئ بواسطة الإنزيم. يتم تسخين الأشرطة المزدوجة مرةً أخرى لدرجة حرارة عالية لمسخ الأشرطة، ثم تُكْرَر دورة التسخين والتبريد مرةً أخرى، إذ يعمل الـ DNA المُصنَّع حديثاً كقالب لصناعة DNA لاحق، وكلّما استمرت دورة الحرارة - برودة تتضاعف جزيئات الـ DNA بشكل هندسي بحيث يتضاعف عدد النسخ في كل دورة بمتواليّة 2، 4، 8، 16 وهكذا، لذلك تُسمى هذه الطريقة تفاعل السلسلة (Chain reaction). تُكْرَر الدورات بشكل نموذجي (20 - 30 مرة) لإنتاج ملايين النسخ من الـ DNA

الأصلي. تحتاج هذه التقنية إلى وقت قصير، لذلك فإن جزيئة مفردة من الـ DNA يمكن تضخيمها لصناعة ملايين النسخ خلال بعض الساعات، وبعد تضخيم الـ DNA يمكن تحليله ودراسته بطرق مختلفة. تتفوق هذه الطريقة على غيرها من الطرق القديمة من خلال:

1. يمكن أن تستعمل مع كميات قليلة من الـ DNA (نانوغرام وحتى بيكوغرام مقارنةً بما تحتاجه الكلونة إلى ميكروغرامات) حتى ولو كانت مستخلصة من بقعة دم قديمة مضى عليها سنين، أو شعرة مفردة، أو لعقة لعاب على ظهر طابع بريدي تكون كافية للتحليل.

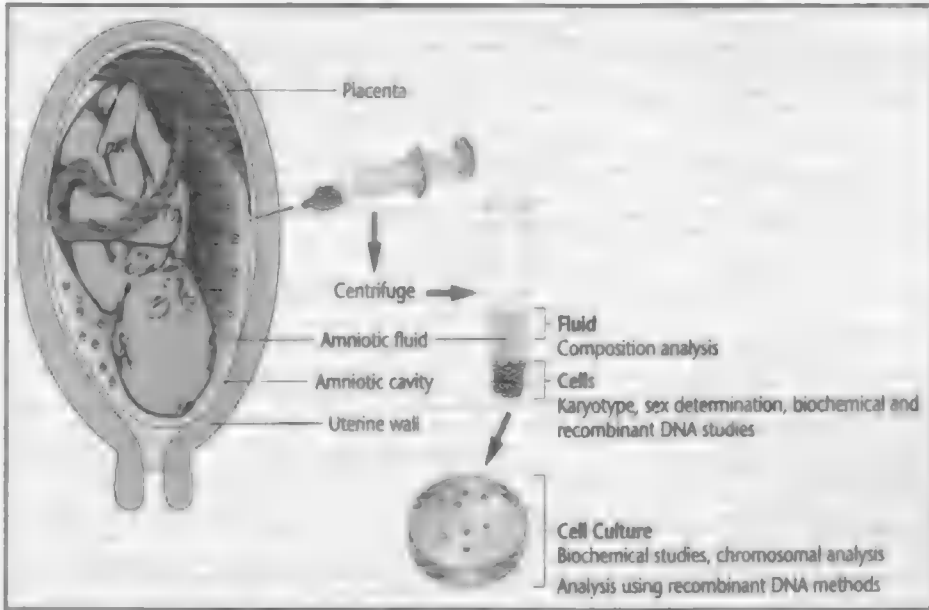
2. لا تتطلب كلونة جينية، لذلك تكون سريعة، فمثلاً التشخيص الوراثي لمرض خلايا الدم المنجلية (Sickle cell disease) يتطلب أسبوعاً أو أكثر في التقنيات القديمة، في حين يمكن إنجازه في يوم واحد باستعمال تقنية الـ PCR.

3. بما أن الـ PCR تُنتج كميات كبيرة من الـ DNA النقي جداً، فإنها لا تحتاج إلى مجسّات مُعلّمة إشعاعياً للكشف عن DNA مُعيّن أو طفرة معيّنة، لذلك يمكن الاستعاضة بمجسّات غير مُشعة مُعلّمة بالبايوتين مثلاً.

4. تستغرق تلك العملية يوم واحد ونصف اليوم تقريباً من البدء وحتى الحصول على الصورة الإشعاعية الذاتية، إذ إن القطع المُضخّمة يمكن أن يتم تعليمها ودراسة التسلسل النيوكليوتيدي لها (باستعمال هلام الأكريل أمايد المعد لدراسة تسلسل الـ DNA).

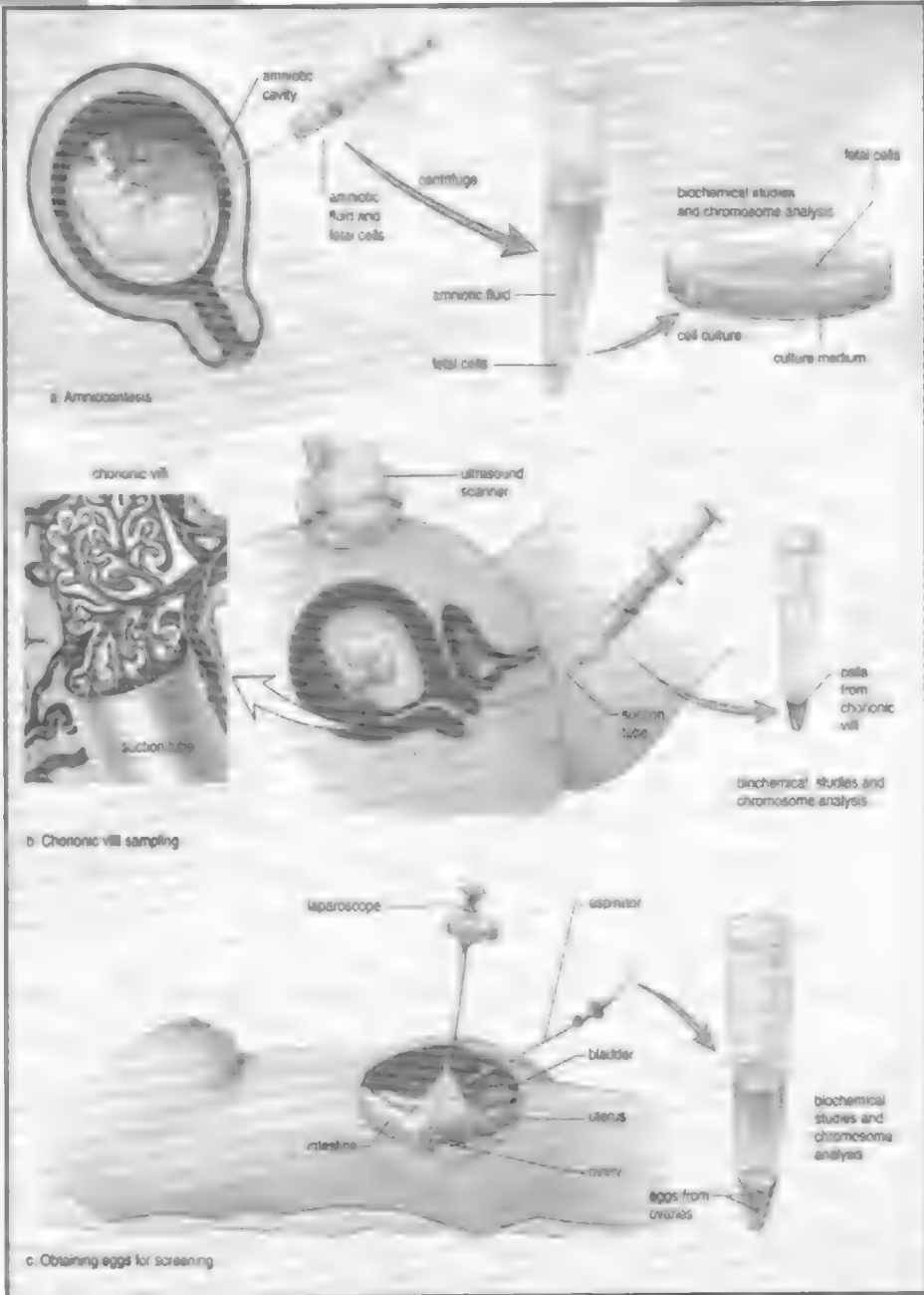
لقد استعملت هذه التقنية في تشخيص الأمراض الوراثية، والوراثة التطورية، إذ نجحت بالتعامل مع DNA الجنين، فبعد إدخال حقنة طبية خاصة خلال جداري البطن والرحم، وأخذ عيّنة من الخلايا الموجودة في السائل الأمنيوسي المحيط بالجنين. يتم إكثار هذه الخلايا واستخلاص الـ DNA، ثم تُطبّق البصمة الجينية (شكل 8 - 9). ويمكن أن تؤخذ العينة من الزغابات الكورينية (CVS) (Chorionic villi sampling) أو من البويضات المسحوبة من المبايض (شكل 8 - 10). كما استعملت لتحليل عينات الـ DNA المستخلص من عظام المومياءات القديمة وحتى التي بعمر 30000 سنة في

عينات إنسان النياندرتال، إذ أظهر هذا التحليل بأن الإنسان الحديث يختلف جينياً عن النياندرتال. واستعملت أيضاً وبشكلٍ فعال في علم الطب العدلي كأداة علمية مهمة في حل لغز الكثير من الجرائم المعتمدة على عينات النطف المأخوذة من مهبل الضحية المُغتصبة، أو خلايا جلد المجرم التي أخذت من أظافر الضحية، أو بقعة دم، أو شعرة، وغيرها من الأدلة المتوفرة في مسرح الجريمة. ولكن يجب تحاشي تلوث العينة قدر الإمكان.



شكل (8 - 9). تقنية اختبار السائل الأمنيوسي المحيط بالجنين

في البداية يُحدّد موقع الجنين بواسطة جهاز الموجات فوق الصوتية، ثم تُدخل حقنة طبية خاصة عبر جدار البطن والرحم لسحب السائل والخلايا الجنينية لإجراء التحليلات الخلوية الوراثية والجزيئية.



شكل (8 - 10). الحصول على العينات اللازمة لإجراء بصمة الـ DNA من بطن الأم
 a. من السائل الأمنيوسي. b. من الزغابات الكوريونية. c. من البويضات.

خطوات إجراء البصمة الوراثية للـDNA:

نحتاج في كثير من الأحيان إجراء بصمة الـDNA لعينة ما، إذ يتطلب ذلك قدر الإمكان إلى عينة قليلة التلف، ففي الظروف التي تساعد على تلف العينات، فإن التكررات الحاصلة في الـDNA تؤدي إلى تحليل الـDNA بسرعة لجزئيات أصغر مسببة خسارة العينة. ولحسن الحظ لا يؤدي لتلف النسبي إلى ظهور أشرطة كاذبة في بصمة الـDNA، إذ إن أشرطة الـDNA تتجزأ فراداً بشكل عشوائي، فتتلف كل خلية على نحو مختلف.

وتتم الخطوات التجريبية لهذا لتحليل في المختبرات الجنائية كما هو موضح أدناه:

1. استخلاص الـDNA (DNA extraction):

يمكن استخلاص الـDNA من أغلب أنسجة الإنسان تقريباً، إذ إن مصدر الـDNA الموجود في مسرح الجريمة قد يتضمن الدم أو النطف أو نسيج من الضحية الميتة (Deceased victim)، أو خلايا موجودة في بُصيلة الشعرة أو اللعاب، ويتم مقارنة الـDNA المستخلص من الأدلة المتوفرة (عينات الدليل Evidence samples) مع عينات المصدر (Reference samples) المستخلصة من الدم، والتي تعود لأفراد معروفين (المُشتبه بهم).

2. تقطيع الـDNA بإنزيم قاطع

Digestion of DNA with a restriction endonuclease

يتم معاملة الـDNA المستخلص مع إنزيم قاطع، وهو الإنزيم الذي سوف يقطع الشريط المزدوج للـDNA، إذ يوجد التسلسل المتخصص الذي يُميّزه هذا الإنزيم، مع العلم بأن الإنزيم المستعمل يجب أن لا يقطع التسلسلات المتكررة من داخلها، بل تكون أماكن القطع على جوانبها. وأكثر الإنزيمات استعمالاً في مجال تحليل الـDNA الجنائي هو *HaeIII* الذي يقطع الـDNA عند التسلسل 5'- GG↓CC - 3'. كذلك تستعمل إنزيمات أخرى في هذا المجال.

3. الترحيل الكهربائي في هلام الأجاروز Agarose gel electrophoresis:

بعد تقطيع الـ DNA فإن القطع المتكونة يتم فصلها اعتماداً على الحجم في الهلام، وخلال الترحيل فإن الـ DNA سوف يُهاجر باتجاه القطب الموجب. فالجزيئات الصغيرة من الـ DNA تتحرك بشكل أسرع من الكبيرة خلال ثقوب مادة الهلام، وينتج عن ذلك انفصال وتوزيع لقطع الـ DNA اعتماداً على الحجم الجزيئي بحيث تهاجر قطع الـ DNA الصغيرة لمسافة أكبر ابتداءً من حفرة تحميل العينة.

4. تحضير وصمة سودرن Preparation of Southern blot:

ما يلي عملية الترحيل الكهربائي هو مسخ الـ DNA وهو لا يزال في هلام الأجاروز، من خلال تغطيس الهلام في محلول قاعدي. وبلي ذلك معادلة المحلول القاعدي ونقل الأشرطة المفردة من الـ DNA إلى سطح غشاء التهجين، إذ ينتقل الـ DNA على الغشاء بشكل مُطابق له عندما كان في الهلام.

5. التهجين مع مجس مُعلّم إشعاعياً

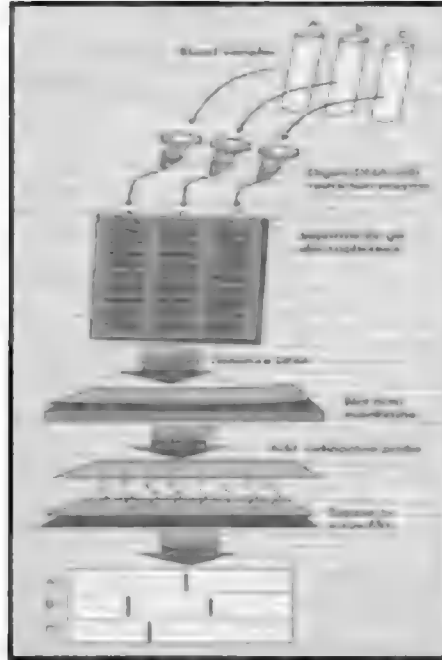
Hybridization with radioactive probe

يُحدّد الهدف من بصمة الـ DNA استعمال مجس موقع مفرد أو مجس متعدد المواقع. إن مجس الموقع المفرد هو تسلسل من الـ DNA أو الـ RNA قادر على التهجين (تكوين مزدوجات DNA - DNA أو RNA - RNA) مع قطع خاصة من الـ DNA بوصمة سودرن. إن مجسات الموقع المفرد يتم تعليمها في العادة بنظير مُشع لسهولة الكشف، وتُختار لتحديد موقع وراثي واحد متنوّع على كروموسوم بشري مفرد. يتم تغطيس غشاء وصمة سودرن (الخطوة 4) في محلول يحتوي على المجس المُعلّم إشعاعياً تحت ظروف حرارية وتراكيز ملحية ملائمة لعملية التهجين الجزيئي. بعد التهجين يتم غسل المجسات الغير مرتبطة، ولهذا يبقى فقط المجس المُعلّم مرتبطاً مع الـ DNA المُستهدف.

6. تحديد الـ RFLPs بواسطة التصوير الإشعاعي الذاتي

Detection of RFLPs via autoradiography

يتم تحديد موقع المجس المشع المُتهجن مع الغشاء بواسطة التصوير الإشعاعي الذاتي. في هذه التقنية يوضع الغشاء المغسول فيما بعد تحت فلم حساس للأشعة السينية (X-ray)، إذ يُطبع على الفلم موقع تحلل المادة المُشعة. بعد التعريض وتوضيح الفلم فإن النتائج المسجلة لتهجين سوزرن يُطلق عليها صورة شعاعية ذاتية (Autoradiograph) أو تُختصر Autorad (شكل 8 - 11).



شكل (8 - 11). تقنية وصمة سوزرن (Southern blotting) لتهجين الـ DNA

المستخلص من الدم والمرخل على هلام الأجاروز

7. إعادة وصمة سوزرن مع مجسات إضافية

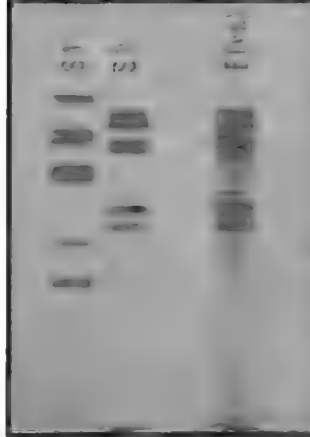
Re-probe southern blot with additional probes

في التحليل الجنائي النموذجي للـ DNA فإن تنوعات الـ DNA على بعض الكروموسومات المختلفة يتم توصيفها، فبعد الحصول على صورة Autorad لمجس

الموقع المفرد، يتم غسل هذا المجس من غشاء وصمة سودرن باستعمال محلول ذو درجة حرارة عالية، ل يبقى بذلك فقط الـ DNA على الغشاء. يمكن عند ذلك إجراء وصمة سودرن مرة أخرى مع مجس موقع مفرد ثاني مُعلّم إشعاعياً، وتكرار الخطوات 5 - 7 لسلسلة من مجسات موقع مفرد أخرى. إن مجموعة من صور التهجين لوصمات سودرن تُعرف بصورة الـ DNA (DNA profile).

يستعمل في الوقت الحاضر أكثر من 12 مجس من مجسات VNTR المختلفة في التحقيقات الجنائية النموذجية (شكل 8 - 12)، إذ يتواجد تسلسل أغلب هذه المجسات على كروموسومات مختلفة، وكل مجس يمكن أن يستعمل لإظهار نمط VNTR لموقع جيني خاص. كما أن التحقيقات الجنائية النموذجية تستعمل 4 - 6 مجسات VNTR لإعطاء نمط أو بصمة تفصيلية جينية دقيقة.

8. يتم تفسير بصمة الـ DNA المأخوذة من مسرح الجريمة ومقارنتها مع الـ DNA المستخلص من الدم أو النطف المأخوذة مباشرة من الشخص المشتبه به.



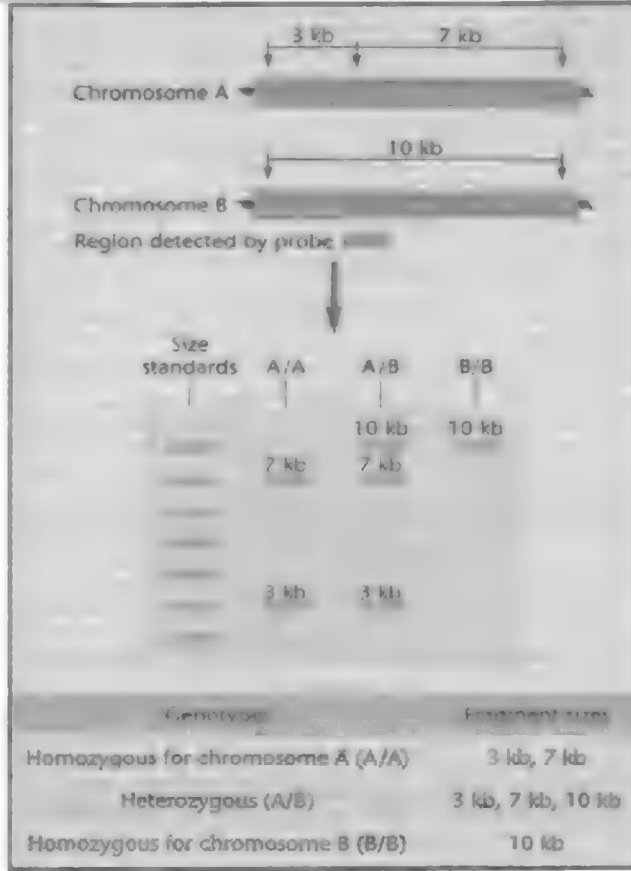
شكل (8 - 12). بصمة DNA لحالة جنائية

إن نمط الـ DNA للمُشتبه به رقم 2 (S2) يتطابق مع نمط الـ DNA المستخلص من الدم المُحصّل عليه كعينة دليل (VS) E. في حين لا تتطابق بصمة الـ DNA للمُشتبه به الأول (S1) مع عينة الدليل.

الـ RFLPs كمعلومات وراثية RFLPs as genetic markers:

يحدث التباين في التسلسل النيوكليوتيدي خلال الجينوم البشري (في الغالب في المناطق غير المُشفّرة Noncoding regions) بتردد بحدود 1 لكل 200 نيوكليوتيدة.

وبتغير التسلسل في موقع خاص، فإن تغير نيوكليوتيدة مفردة يمكن أن يكون أو يحذف موقع قطع إنزيمي (راجع الفصل السادس). وقد يحدث تكوين موقع إنزيمي بسبب مثل هذا التغير على أحد الكروموسومات، ولكن سوف يغيب عن نظيره، ولذلك فإن الكروموسومين يمكن تمييزهما عن بعضهما من خلال نمطيهما عند إجراء التقطيع الإنزيمي، وإجراء وصمة سودرن (شكل 8 - 13). فمثلاً المنطقة في كروموسوم A المبيّنة في الشكل تحتوي على ثلاثة مواقع قطع للإنزيم *BamHI*، أما نظيره الكروموسوم B فإنه يحتوي على موقعين. فعند قطع كروموسوم A بالإنزيم *BamHI* تتكون قطعتين وهما 3 kb و 7 kb (على افتراض أن الحجم الجزئي للقطعة يساوي 10 Kb). في حين تتكون قطعة واحدة حجمها 10 kb عند قطع الكروموسوم المناظر. وباستعمال مجس من هذه المنطقة الكروموسومية فسوف يُعطي وصمة سودرن كما هي واضحة في الشكل سالف الذكر. إن مثل هذا التباين في أطوال قطع الـ DNA المتولدة بالقطع بإنزيم قاطع يسمى RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms). يُعدّ الـ RFLPs شائعاً ويمثل تغيّراً ضيقياً، ويحدث من خلال التغيرات التي تحدث في زوج نيوكليوتيدي واحد، أو من خلال حذف أو إدغام زوج قاعدي أو أكثر. لقد تمّ تحديد بعض الآلاف من الـ RFLPs في جينوم الإنسان، ولوحظ عدد كبير منها على كروموسومات مفردة، إذ إن هذه التغيرات تورث كآليلات ذات سيادة مشتركة (Codominant alleles). ويمكن رسم الخريطة عند مناطق خاصة على كروموسومات مُنفردة، وتستعمل لتعقب تورث الأمراض الوراثية وصفات أخرى من جيل إلى جيل في عوائل معيّنة.



شكل (8 - 13). RFLPs

إن الأليلات على كروموسوم A و B تمثل قطع DNA من كروموسومات متناظرة. إن المنطقة التي تهجن مع المجس موضحة أعلاه. الأسهم تُشير إلى موقع القطع الإنزيمي التي تميز الأليلات. إن مواقع القطع الثلاث على الكروموسوم A تولّد قطع 3 kb و 7 kb. يوجد على كروموسوم B موقعين للقطع فقط تولّد قطعة 10 kb. غياب موقع قطع على B قد يتج عن طفرة في قاعدة مفردة ضمن موقع القطع الإنزيمي. ويسبب تلك الاختلافات في مواقع القطع التي تورث بأسلوب السيادة المشتركة، سوف يوجد 3 أنماط وراثية، وهي: AA، AB، BB. إن التركيب الأليلي لأي فرد يمكن تحديده بواسطة التقطيع الإنزيمي للـ DNA الجينومي (المتحصل عليه من عينة دم أو أرومات ليفية جلدية Fibroblast)، ثم إجراء الترحيل الكهربائي، ثم النقل إلى أغشية التهجين وإجراء التهجين مع مجس مناسب لتطبيق وصمة سودرن.

يُطبق إجراء الـ RFLPs في عدد من تجارب علم الأحياء الجزيئي، أهمها فحص الطفرات الجينية في الجينوم البشري، والتي تؤدي في الغالب إلى أمراض وراثية، إذ يظهر لها نمط خاص من الـ RFLPs. ويُعد هذا النمط تأكيداً على أن الشخص يعاني من المرض الوراثي، ولكن عدد الأمراض التي يمكن دراستها بهذه الطريقة محدود، ليس بسبب قلة إظهار النمط RFLP، ولكن لقصور معلوماتنا حول الجينات وعن تركيبها وما تدل عليه الأنماط الناتجة عن هذا الإجراء. ورغم ذلك برهنت هذه الطريقة على فعاليتها في تشخيص عدد من الأمراض مثل الثلاسيميا (Thalassaemia) الناتج عن خلل في جينات الجلوبين (Globin)، وفي تشخيص بعض أنواع الهيموفيليا (Haemophilia).

أما الطريقة البديلة فهي التي تسمى تحليل الأنماط المرتبطة (RFLP Linkage analysis)، والتي لا تعتمد على الـ RFLP مباشرة في الجين المعطوب، وإنما تعتمد على تمييز القطع الإنزيمية متعددة الأطوال (RFLP) الموجودة في مكان ما في محيط أو بجوار الجين المعطوب. فإذا كانت هذه القطع (RFLPs) قريبة جداً فإنه من المحتمل أن تورث مع الجين المعطوب. وإن أحداث إعادة التركيب التي تنشأ أثناء الانقسام الاختزالي (Meiosis) سوف لا تفصل هذه القطع (RFLP) عن الجين، وعليه يُعد وجود هذه القطع مؤشراً واضحاً على الجين المعطوب.

بصمات الـ DNA DNA Fingerprints

كما ذكرنا سابقاً فإن الـ RFLPs تكون شائعة في جينوم الإنسان، ويمكن استعمالها كعلامات وراثية. كما أن هنالك نوعاً آخر من التغيرات النيوكليوتيدي تم اكتشافه في أواسط الثمانينيات، والذي يعتمد على التغيرات في طول عناقيد تسلسلات الـ DNA المترادة (Repetitive DNA sequence clusters). هذه التسلسلات وتنوعات أخرى في الـ DNA الإنسان أدت إلى تطوير طرق لتشخيص الأفراد، وأُسست درجات من القرابة الوراثية للأفراد. واحدة من تلك التقنيات سُميت بصمة الـ DNA. وفيما يلي وصف لأنواع تلك البصمات.

طرق تحليل البصمة الوراثية:

بعد جمع الآثار البيولوجية والمُخلفات البشرية من مسرح الجريمة أو جسم الضحية، كالدم أو اللعاب أو السائل المنوي أو الإفرازات المهبلية أو بقايا نسيجية مختلفة كبصيلات الشعر وبقايا الأظافر والجلد وغيرها، فإنه يتم تحديد الأسلوب الذي يُتبع لتطبيق البصمة الوراثية بناءً على طبيعة العينة وكميتها. وبشكل عام يستغرق عمل البصمة الوراثية مدة تتراوح بين 5 أيام و 3 أسابيع حسب طبيعة الحادث والطرق المعتمدة في استخلاص الـ DNA وتوصيفه.

إن من أهم طرق تحليل بصمة الـ DNA ما يأتي:

أولاً: البصمة الوراثية المعتمدة على استعمال مناطق الـ DNA مختلفة الأطوال والانتشار (RFLP – VNTR method):

تعتمد هذه الطريقة في تمييز الأشخاص على التباينات في الـ DNA طبقاً لطول أو عدد تكرارات معينة، أو ما يُسمى بالتتابع الكروموسومية الصغيرة، إذ نتجت هذه الاختلافات عن طفرات وراثية سابقة، أدت إلى عدم تواجد المواقع التي تميزها الإنزيمات القاطعة، وبذلك فإن المنطقة نفسها في الجينوم تُقطع بواسطة الإنزيم القاطع نفسه إلى أجزاء مختلفة في الأشخاص المختلفين، أي أنه على الرغم من اختلاف هذه القطع في أطوالها، إلا أن كل منها يحتوي بداخله على تسلسلات من القواعد بحدود 15 - 10 - قاعدة مشتركة بين الكثير من هذه القطع. إن خير مثال على مناطق RFLPs هو بعض التسلسلات المتكررة التي تورث بصورة ترادفية، والتي تختلف من شخص لآخر (VNTR) (شكل 8 - 14)، سواء بعدد التكرارات أو بطول التسلسل نفسه، إذ تورث هذه الأنماط أو العلامات الوراثية من الأب والأم بالتساوي، كما استعملت مجتمات VNTR المشتقة من جين الميوغلين في الإنسان لزيادة القدرة التمييزية في بصمة الـ DNA (راجع الفصل السابع لمزيد من المعلومات).

AATTGC AATTGC AATTGC (أ)

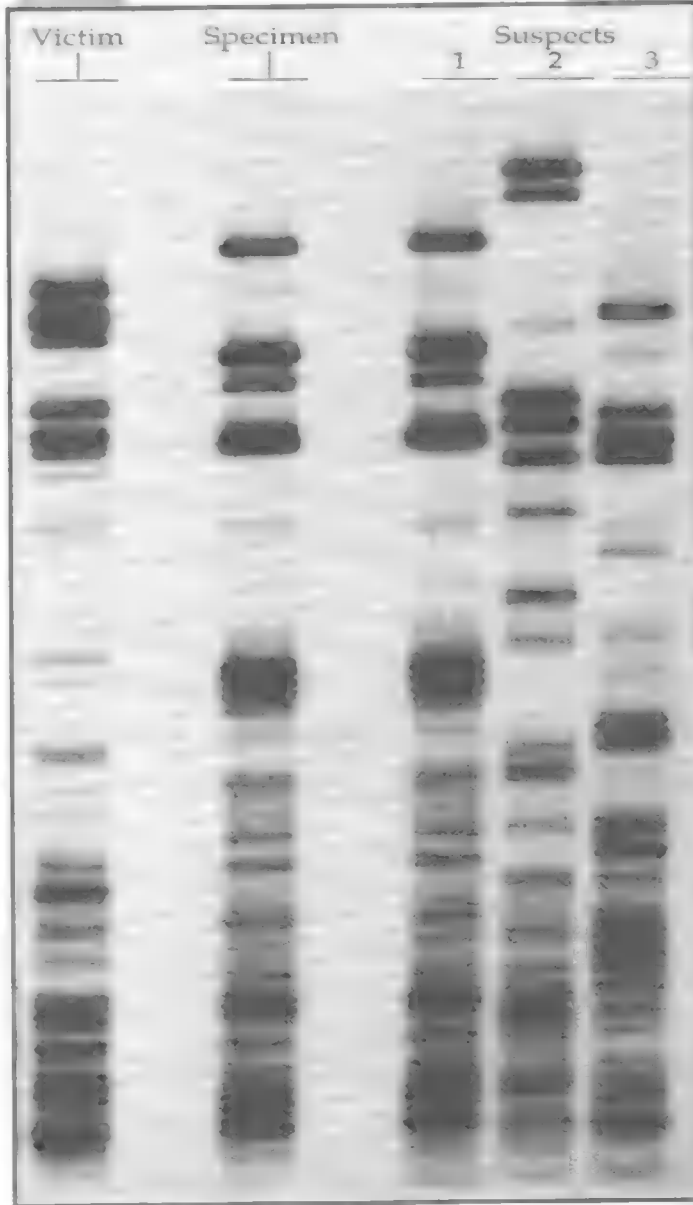
AATTGC AATTGC AATTGC AATTGC AATTGC (ب)

شكل (8 - 14). التباين في تكرار التسلسلات المتكررة المترادفة

إن طول التسلسلات في الشخصين مُكوّن من 6 قواعد، لكن التكرارات في DNA الشخص أ هو 3، أما في الشخص ب فهو 5.

بعد استخلاص وتنقية الـ DNA بشكل جيد، يتم تقطيعه بإنزيم قاطع، وتُطبّق وصمة سوذرن مع مجسّات محددة طبقاً للحالة والعينة، ثم إبداء الرأي الفني بالنتيجة.

تعتمد القدرة التمييزية لبصمة الـ DNA المأخوذة بهذه الطريقة على عدد مواقع الاختلافات وعلى عدد المرات التي تتكرّر بها هذه الاختلافات بين الأشخاص. وعند إجراء تحليل لعينات بيولوجية من عدّة أشخاص، نجد أنه إذا كان الاختلاف في موقع واحد فإن الحد الأقصى للحُزم التي يمكن مشاهدتها هو اثنتان، واحدة على كل كروموسوم في زوج الكروموسومات المتماثلة، إذ تمثّل الحُزمة الأولى ما يرثه الشخص من أبيه، بينما تمثّل الثانية ما يرثه من أمه. وعلى الرغم من صعوبة استعمال وتفسير نتائج المجسّات متعددة المواقع عند استعمالها في هذه الطريقة، كونها تُعطي نمطاً متعدّد الحزم قد يصل إلى 30 أو حتى 200 حزمة منتشرة في مواقع مختلفة (Bar-code patterns)، إلّا أن العلماء يُفضّلونها لأنها تُعطي قدرة تمييزية عالية عند تحليل بصمة الـ DNA، وخصوصاً في القضايا الجنائية وإثبات النسب، إذ يمكن تحديد هوية الفرد بصورة تكاد تكون قطعية. ففي الشكل (8 - 15) مثلاً يظهر أحد أنواع بصمات الـ DNA، إذ تمّ إجرائها من بقعة دم (Blood stain) وُجدت في مسرح الجريمة، وقد تطابقت مع بصمة DNA المُشتبه به رقم 1، ولكنها لم تتطابق مع بصمة الـ DNA للمُشتبهين 2 و 3، ممّا يؤكّد تورّط المُشتبه به الأول في هذه الجريمة.



شكل (8 - 15). بصمة DNA

طبقت بالاعتماد على الـ DNA المعزول من بقعة دم وُجدت في موقع الجريمة، ومن الدم المُحصّل عليه من ثلاثة أشخاص مُشابه بهم.

في عام 1987 رفض قاضي فلوريدا الطلب المُقدّم من قبل النائب العام لإحضار التحليل الإحصائي حول دليل الـDNA ضد أحد المتهمين بالاغتصاب، وبعد محاكمة خاطئة، أُطلق سراح المُشتبه به. وبعد مرور 3 أشهر أُعيد المتهم إلى المحكمة بسبب اتّهامه بجريمة اغتصاب أخرى. في هذا الوقت سمح القاضي للنائب العام بإحضار التحليل الإحصائي للمعلومات المعتمدة على مسوحات سكانية مناسبة. لقد أظهر التحليل بأن بصمة الـDNA المُحضرة من النُطف المأخوذة من الضحية تكون باحتمالية تقارب 1 / 10 بليون لتطابق بصمة DNA أخرى لغير المتهم بالصدفة، وهذا يعني تطابق البصمة المُحضرة من مسرح الجريمة مع بصمة المتهم بشكلٍ يكاد يكون مُطلقاً دون شك، ولذلك فقد تمّ بالفعل إدانة المتهم بجريمة الاغتصاب.

سليبات البصمة الوراثية المعتمدة على الـVNTR – RFLP:

في الغالب تتطلّب طريقة الـVNTR – RFLP عينة كبيرة نسبياً من الـDNA محفوظة بحالة جيدة لا تؤدّي إلى تلفها. وطالما أن من الصعوبة الحصول على عينة مناسبة في المُخلفات الجنائية لمسرح الجريمة من ناحية قِلّة العينات واختلافها أو تعرّضها لعوامل جوية بيئية مختلفة من الحرارة والضوء والرطوبة وغيرها، الأمر الذي يؤدي إلى تحلّل الـDNA في تلك الكميات الصغيرة، وضعف صلاحيتها، ممّا يحدّ من استعمال تلك الطريقة، بحيث نضطر هنا للجوء إلى استعمال الـPCR للتقليل من الأثر التدميري الذي حلّ بالـDNA بفعل أشعة الشمس أو ارتفاع درجة الحرارة والرطوبة مثلاً. فضلاً عن ذلك، هنالك سليبات أخرى تتمثّل في أن بعض تكرارات VNTR قد تُبدي بعض التشابه بين الأفراد، لذلك لا بُدّ من استعمال مجسّات أكثر حساسية، مثل: YNH24 أو EDF64 أو CMM86 وغيرها.

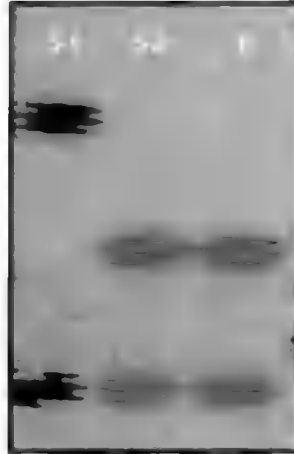
كما أن بعض المجسّات المستعملة في هذه الطريقة يمكن أن ترتبط مع تسلسلات DNA يشترك فيها الإنسان مع حيوانات أخرى كالكلاب والقطط والطيور، وهذا يُزيد من احتمالية ظهور بصمة DNA خاطئة، الأمر الذي يستدعي ضرورة الحذر وتحديد نوع الكائن الحي عند تحليل بصمة الـDNA.

وأخيراً تُعدُّ هذه الطريقة مُستهلكة للوقت، إذ إن غشاء التهجين يجب أن يُهجن بشكل متسلسل مع 4 - 5 مجسّات مختلفة، كل واحد منها يُشخص تسلسلات مختلفة من الجينوم خصوصاً وأن كل مجس يجب أن يُزال بشكل كامل بالغسل قبل استعمال المجس التالي وهكذا. ولهذا فإن العملية بشكلٍ كامل قد تستغرق أسابيع.

ثانياً: البصمة الوراثية المعتمدة على استعمال الـ PCR والمتكررات المترادفة القصيرة (PCR - STR method):

بسبب السليبات التي ذُكرت في الطريقة السابقة، لجأ العلماء إلى تطوير استراتيجية مساندة لاستغلال العينات القليلة أو القديمة، والتي تعتمد على الـ PCR لإكثار مناطق من الـ DNA تُعرف باسم المتكررات المترادفة القصيرة (STRs Short tandem repeats)، إذ يحتوي كل من هذه المتكررات على تسلسل قصير مكوّن من 2 زوج قاعدي، ويُعيد هذا الجزء نفسه عدداً من المرات يختلف من شخص لآخر، والتي تُعدّ من المميزات الفردية الثابتة والقوية جداً.

تمّ تطوير 13 تسلسل رباعي (تكرارات من أزواج قاعدية رباعية) من STRs كلوحة توسيم تستعمل من قبل FBI لتكوين موقع معلومات لأنماط الـ DNA في التحقيقات الإجرامية (شكل 8 - 16).



شكل (8 - 16). بصمة DNA لحالة جنائية

نمط الـ DNA للمُشتبه 2 (S2) يُطابق نمط بقعة الدم المُتَحَصَّل عليها من الدليل E.

ونتيجة لذلك فقد حلت STRs محل VNTRs في أغلب المختبرات الجنائية، لكونها أرخص، وأقل جهداً، وأسرع إنجازاً من تحليل RFLP، وقد حلت محل تنميط VNTR في أغلب المختبرات المتعلقة باختبار الأبوة.

عندما يتم تكوين التركيب الوراثي للأليلات لكل المواقع الثلاثة عشر لكـ CODIS STR (كلها 26 أليل) لإنتاج نمط كامل من STR، فإن الفرصة النموذجية في كون أي شخص يمتلك هذا التشكيل هي 1 في 100 ترليون. وطالماً أن عدد كل سكان العالم هو فقط بحدود 6 بليون، فإنه من السهل معرفة لماذا يُشار إلى تحليل STR في الغالب بالاختبار التشخيصي لـ DNA الإنسان (Human DNA identification testing).

كما يُستعمل في هذه التقنية مجسات مُعلّمة بالنظائر المُشعّة، وكلما زاد التطابق بين العينة المعروفة والعينة المجهولة (الدليل) كان ذلك شاهداً ضد الشخص المتهم.

يستهدف في الـ PCR تسلسلات متغيرة تختلف عن التسلسلات المتغيرة المستهدفة في تقنيات الـ RFLPs، إذ إن المواقع المستهدفة تتكوّن غالباً من 7 - 9 من التسلسلات المتكررة المترادفة. لذلك تعتمد هذه الطريقة على تضخيم التتابع الكروموسومية الدقيقة.

يمكن الحصول على نتائج جيدة باستعمال طريقة الـ STR - PCR من أي عينة بشرية تحتوي على DNA، ولو كانت خلية واحدة من بصيلة شعرة أو رذاذ عطاس أو بقايا ألعاب على ظهر طابع بريدي، أو ألعاب يستعمل في لصق حافة ظرف رسالة، أو بقايا ألعاب على عقب سيجارة أو حافة كوب شراب. وقد نجحت هذه الطريقة في الاستفادة من عينات خلايا متنوعة تمّ تخزينها لأكثر من 10 سنوات، كما أنها أعطت نتائج ممتازة في حالات تعفن وتحلل العينات كالهياكل العظمية للمومياء المصرية التي تجاوز عمرها 2400 سنة. وكان لذلك الأثر البالغ في حالات إعادة التحقيق في قضايا طُويت ملفاتها أو كُشف النقاب عنها بعد فترة طويلة من وقوعها.

ثالثاً: البصمة الوراثية المعتمدة على DNA الماييتوكوندريا mtDNA:

يتضمّن هذا التحليل دراسة تسلسل mtDNA (حسب طريقة سانجر) بالاعتماد على PCR، إذ يُستعمل الـ PCR لتوليد قالب الـ DNA لدراسة التسلسل. يُعدّ هذا

التحليل أكثر قوة من تحليل الـ STR، وذلك لأن الماييتوكوندريا المسؤولة عن توليد الطاقة في الخلية تتواجد بأعداد تصل إلى الآلاف في الخلية الواحدة، وهذا يجعل منها مصدراً مهماً وضخماً وثابتاً للمعلومات الجينية مقارنةً بالـ DNA الموجود في النواة (راجع الفصل الثالث لمزيد من المعلومات). وحيث أنه لا توجد تسلسلات متكررة في mtDNA يُفضل بعض العلماء استعمال جزيئات DNA معينة لتصنيف بعض التسلسلات المتباينة في القواعد الأساسية من الـ mtDNA مثل AGTCGA، إذ استعملت هذه الطريقة لتحليل بقايا أو أشلاء بشرية من أنسجة عظمية زاد عمرها على 7 آلاف عام لحل بعض الألغاز التاريخية الغامضة. وعليه تُعدُّ بصمة mtDNA الخيار الوحيد، إذا ما أُريد التعرف على العلاقة في قرابة النسب بين أجيال حية مُعاصرة وأخرى بائدة.

وبشكل عام فإن جينوم الماييتوكوندريا كما هو الحال في جينوم النواة يتعرّض إلى تراكمات بطيئة للتغيرات العشوائية في الـ DNA عبر الزمن، وهذه التغيرات يمكن أن تستعمل كمقاييس للزمن وللمسافات التطورية بين الكائنات. ولكن جينوم الماييتوكوندريا يتميز باختلافين مهمين، وهما:

1. إن الحركات الزمنية (تَكَات ساعة الزمن Clock ticks) لجينوم الماييتوكوندريا أسرع بعشرة أضعاف مقارنةً بالحركات الزمنية لجينوم النواة، وبسبب هذه السرعة فإن mtDNA يُعدُّ مناسباً في تعقب أدلة حديثة أكثر تُقاس لآلاف من السنوات الماضية.
2. في الفقرات كل الماييتوكوندريا هي من منشأ أمومي (Maternal origin) (وراثية سايتوبلازمية أو تُسمى تأثير أمومي، لأنها تورث من الأمهات فقط وليس الآباء^(*)). وهذا يلغي إمكانية حدوث التغيرات في التسلسل النيوكليوتيدي الناجمة عن إعادة التشكيل (Recombination) الجنسي، بحيث أن زوج من الأفراد المتزاوجين يمكن أن ينقلون نوع واحد من الـ mtDNA ولكنهم ينقلون أربعة أطقم

(*) نجد من الطريف هنا الإشارة إلى المثل الشعبي الذي يقول: "ثلثين الولد على خالة". وعلى ما يبدو أنه استُنتج من الملاحظات العامة لتشابه صفات النسل مع أخواهم، والناتج عن هذا النوع من التوريث.

أحادية المجموعة الكروموسومية من الجينات النووية، ولذلك فإن الـ mtDNA أسهل تعقّباً عبر الأجيال والزمن.

لقد قامت الباحثة Rebecca Cann وزملائها من جامعة كاليفورنيا بجمع الـ mtDNA من 147 امرأة من مجاميع سكانية مختلفة تعود لأفريقيا وآسيا وأوروبا وأستراليا ونيوغينيا، إذ قُطع الـ DNA، وتم تحديد ومقارنة نمط القطع وإنجاز بصمة الـ mtDNA ووضع شجرة الـ DNA للمايتوكوندريا، إذ كانت النتائج غير متوقّعة ومثيرة للعجب، تمخّض عنها عدد من المسائل، وهي:

1. بالاعتماد على الشجرة فإن هنالك سلف مشترك مفرد من الـ DNA أصبح شائعاً يُعرف بمايتوكوندريا حواء (Mitochondrial Eve)، وهذا لا يعني أن أنثى واحدة فقط كانت المكوّن لنا، ولكن بدلاً من ذلك فإنه من بين مجموعة سكانية (من المحتمل أن تبلغ بعض الآلاف) وبالصدفة فقط مجموعة واحدة من جينات المايتوكوندريا قد مرّرت.

2. إن هذه الأنثى عاشت قبل 200000 ألف سنة مضت (± 50 سنة)، وهذه النتيجة اعتمدت على معدّل الطفرة المعروف في الـ mtDNA.

3. إنها عاشت في أفريقيا، وأساس هذا الاستنتاج هو أن المجموعة السكانية الأفريقية أكثر تنوعاً من غيرها، وهذا يُشير ببساطة إلى أن وجود هذه المجموعة كان الأقدم.

4. بالاعتماد على درجة التباين بين المجاميع غير الأفريقية، فإن المجاميع السكانية المؤسسة الأصلية يمكن أن تكون قد تركت أفريقيا احتمالاً بحدود أكثر من 100000 سنة مضت.

5. لا يوجد دليل على دخول الـ mtDNA جديد سواء في المجاميع السكانية التي بقيت في أفريقيا أو التي استوطنت قارات أخرى.

وإذا أُسندت هذه النتائج بمعلومات إضافية، فلنأخذ سنحصل على صورة واضحة حول سكان البشر الحديث الذين كانوا في أفريقيا قبل 200000 سنة مضت، والذين بدءوا بالهجرة خلال آسيا إلى أوروبا بحدود 100000 سنة مضت، وحلّوا بدلاً من

المجاميع السكانية المقيمة هناك، المتمثلين بالأنواع البشرية *H. sapiens* و *H. erectus* و *neanderthalensis* خلال وصولهم إلى تلك القارات.

ومن الجدير بالذكر أنه في إحدى الدراسات التي تضمنت 21 إنساناً يعودون إلى عروق مختلفة (Different races)، قد وُجد بأن 14 فرداً منهم يمتلكون 64 موقع قطع (Restriction sites) مُتماثل في الـ mtDNA. في حين أظهر 7 أفراد واحداً أو أكثر من الاختلافات، وأنه من بين العينات البشرية المختارة عشوائياً لوحظ ما يُقارب 1 / 250 زوج قاعدي للـ mtDNA كان مختلفاً.

إن القيمة الجناثية للـ mtDNA تقع في الجزء المسمى D - Loop والتي يبلغ طولها تقريباً 1100 bp وتقع في المنطقة غير المشفرة، إذ يوجد في هذا الجزء منطقتين شديديتي التغير Hypervariable regions (HV1 و HV2) والتي يتم تضخيمها بالـ PCR، وهذا يُعطي معلومات حول تسلسل الموقعين 16,024 - 16,365 (≈ 342 bp) و 340 - 73 (≈ 268 bp) على التوالي. بعد ذلك يُقارن التسلسل المدروس مع معلومات تسلسلات الـ mtDNA البشرية المخزنة في الكمبيوتر. إن المنطقة غير المشفرة (تسمى أيضاً منطقة السيطرة) تتغير بحدود 1 - 3% بين الأفراد غير ذوي العلاقة، مع تغيرات تتوزع على منطقتي HV1 و HV2.

لقد ساعد استعمال المعلومات حول تسلسل الـ mtDNA في التعرف على بقايا رفاة قديمة تعود لقيصر روسيا نيكولاس الثاني وعائلته. فقد وُجد في عام 1991 تسعة هياكل عظمية في قبر في مدينة Ekaterinburg في روسيا تعود للقيصر وزوجته (Tsarina Alexandra) وثلاث من بناتهم وثلاثة من الخدم وطبيب العائلة (Eugeny Votkin). وفي عام 1992 طلب علماء من المملكة المتحدة والولايات المتحدة إجراء بصمة الـ DNA لهذه الهياكل التسعة.

لقد تم تحديد جنس تلك الهياكل من خلال تضخيم المواقع الجينية للـ Amelogenin وقد عززت هذه النتائج بالفحص العادي للعظام، وتبين بأن تلك البقايا تعود لأربعة ذكور وخمس بنات. هذا وقد أجريت أيضاً بصمة الـ DNA للهياكل التسعة باستعمال خمسة مُعلّيات من الـ STR، وهي VWA/31 و F13A1 و Thol

وFES/EPs وACTBP2، إذ أشار النمط الحزمي الأليلي إلى أن خمساً من الهياكل تعود للعائلة وتتضمن الأب والأم وثلاثة أطفال.

رابعاً: معلومات الـ DNA المتعددة الشكل المكبرة عشوائياً (رابد) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA Markers):

لقد حققت هذه التقنية بعض النجاح في دراسة البصمة الوراثية وذلك لسهولة استخدامها، إذ تتطلب كميات قليلة من الـ DNA، وعدم الحاجة إلى تعليم البوداي المستعملة بالمواد المشعة كما في بعض التقنيات الأخرى. كما أنها غير مكلفة وذلك لاستعمال بوداي عشوائية (Arbitrary primers) رخيصة الثمن مقارنةً بالبوداي المتخصصة (Specific primers) غالية الثمن. هذا فضلاً عن إمكانية إجرائها في مختبرات بسيطة، إلا أن استعمال هذه الطريقة في البصمة الوراثية لم يلقَ نجاحاً كبيراً وذلك لطبيعة البوداي العشوائية، إذ لا يُعرف موقعها على الكروموسوم، إلا أنه يمكن استعمالها بالاشتراك مع بوداي أخرى معروفة الموقع، وكذلك لا يمكن تمييز الأفراد الخليطة عن النقية للصفة، وهي من النقاط المهمة لتحديد طبيعة توريث الصفة، ولذلك تُعدُّ هذه التقنية من المُعلِّمات السائدة (Dominant markers). ومن العيوب الأخرى في هذه التقنية هو عدم الثبات (Inconsistency)، أي إمكانية عدم الحصول على النتائج نفسها عند تكرار التحليل (Repeatability) حتى على مستوى المختبر الواحد، إلا أن بعض الباحثين يُشير إلى إمكانية التغلب على هذه المشكلة عن طريق استعمال الكميات المناسبة وبالتراكيز المطلوبة من المحاليل المختلفة المستعملة في العمل، وكذلك استعمال درجات حرارة مناسبة لكل بادئ على حدة.

تُعطي طريقة RAPD أو ما يُلفظ رابد (Rapid) تحت الظروف الصحيحة نمط بصمة DNA متفردة لكل فرد، لذلك تستعمل في إثبات الشخصية. وتتضمن تضخيم طاقم من قطع DNA غير معلومة التسلسل. يتم خلط البادئ المُضخَّم مع عينة الـ DNA، وعليه فإن البادئ سوف يلتحم مع كل المواقع على عينة الـ DNA التي تمتلك تزاوج قاعدي مع ذلك البادئ. ولبوداي ذات طول 10 نيوكليوتيدات فإن الارتباط سوف يحدث في بضع آلاف من المواقع المنتشرة عشوائياً خلال الجينوم، وعندما ترتبط

البوداي مع مواقع DNA تكون غير بعيدة جداً عن بعضها (ضمن ما يقارب 2000 نيوكليوتيدة)، فإنه يمكن أن يحدث تضخيم للـ DNA بين تلك المواقع، وبالنهاية ينتج ملايين النسخ من تسلسل الـ DNA يقع بين مواقع الارتباط. وعندما يتم فصل المنتج من مثل هكذا تفاعل بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الأجاروز، فإن كل قطعة DNA مُضخمة تظهر على شكل حزمة DNA مُميّزة. إن مواقع ارتباط البوداي في الجينوم لأي فردين من السكان تكون مختلفة بسبب الاختلافات الصغيرة في تسلسل الـ DNA (مثل تغيرات القواعد، حالات الاندغام Insertions والحذف Deletions). وطالما أن ذلك يؤثر على ارتباط البوداي، فإن عدد ومواقع حزم الـ DNA على الهلام سوف يتغير من فرد إلى آخر. إن نمط الـ DNA الناتج يُعطي بصمة جديدة للـ DNA، وهذا يمثل لقطة فوتوغرافية (Snapshot) متميزة لجينوم الفرد.

عندما يتم الحصول على نمط DNA لنسيج بيولوجي موجود في مسرح الجريمة ويُطابق المُشتبه به، فهذا ليس دليلاً أكيداً على أن النسيج يعود لهذا المُشتبه، ولكن يُستبعد كل الأطراف الذين يمتلكون نمطاً مختلفاً، لذلك فإن الاستراتيجية المضبوطة هي بإنجاز خمسة أو أكثر من الأنماط من العينة نفسها باستعمال بوداي مُضخمة مختلفة، عندما نتحقق من كون هذا المُشتبه به هو المجرم الحقيقي، فإذا ما حدث بأن أنماطاً أكثر أعطت تطابقاً بين العينة والمُشتبه، فهذا يعني عدم احتمال كون العينة الموجودة في مسرح الجريمة قد أتت من شخص آخر غير المُشتبه به. إن احتمالية كون التوافق الكامل لكل أنماط التحزيم يحدث ببساطة بفرضية يمكن حسابها، فعلى سبيل المثال يمثل باحتمالية 1 في 100000 - 1 في 1000000 من التوافق العشوائي (Random match).

لقد استعملت هذه التقنية في دراسة الاختلافات (Polymorphisms) في الكثير من الكائنات الحية امتداداً من البكتريا إلى الإنسان، ولكنها استعملت بكثرة عند دراسة الأنواع النباتية وخصوصاً في برامج التربية النباتية، وذلك من أجل:

1. انتخاب الآباء المتباعدة للحصول على ما يُعرف بقوة الهجين (Hybrid vigour).

2. تقصير فترة برامج التربية التي قد تمتد لعدة سنوات عند استعمال الطرق التقليدية.

3. تحديد درجة النقاوة الوراثية للصفة الوراثي (Intracultivar variability).

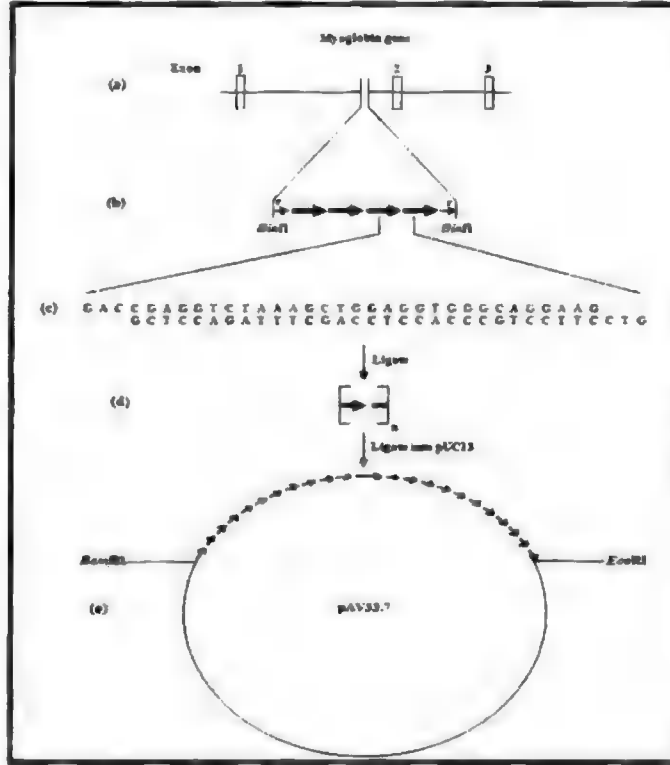
4. تقليل عدد الأصول الوراثية التي يتعامل معها المرء مما يوفر الجهد والمصاريف.

هذا وعلى الرغم من أن اغلب استعمالات هذه التقنية قد تركزت في النواحي النباتية، ولكنها تحتاج إلى المزيد من الدراسة والتدقيق إذا ما أُريد لها النجاح والتطور في مجال بصمة الـ DNA للنواحي العائلية.

ملاحظة: أحياناً يتم الاستفادة من الاعتماد على طريقة تحويل موقع القطع بالـ PCR والتي تُسمى PCR – MRS method (PCR-mediated restriction site modification) في تطبيقات البصمة الوراثية كطريقة مُكمّلة للـ PCR، إذ يتم فيها إدخال موقع قطع صناعي في الجين الطافر من خلال إضافة طاقم من البوائ، أحدها يكون طبيعي، وآخر فيها قاعدة خاطئة التزاوج القاعدي (Mismatched base). وبعد تضخيم عينة الـ DNA بالـ PCR فإن البوائ الحاوي على القاعدة ذات التزاوج الخاطئ ستُنتج أشرطة DNA تحتوي على طفرة نقطية (Point mutation) مجاورة، والتي تكون موقع قطع يُميز الجين الطافر عن الطبيعي.

إحدى الاستراتيجيات المتبعة من قبل جيفري لإنشاء مجس:

لقد قام جيفري وجماعته (1985) بتحضير مجس للـ DNA المتغير للإنسان، إذ تم إنشاء مجس متكرر من التوابع الكروموسومية الصغيرة لمايوجلوبيين الإنسان (Human myoglobin minisatellites) بوساطة تنقية تسلسل مكون من 33 زوج قاعدي، يلي ذلك لصق رأس – ذيل وكلونة للبوليمر المتكون في بلازميد pUC13. إن قطع أي من التشكيلات المتكونة (المُسماة pAV33.7) بوساطة BamHI مع EcoRI ينتج 767 زوج قاعدي من الـ DNA يتضمّن أغلب المتكررات الـ 23 السليمة من تسلسل 33 زوج قاعدي. إذ أثبت هذا المجس قدرة فائقة في تحديد صلة القرى بين الوالدين وأطفالهم. والشكل (8 - 17) يوضح استراتيجية هذه الطريقة.



شكل (8 - 17). إنشاء مجس تهجين متكرر ترادفياً مكون من 33 زوج قاعدي (a و b) ✓
 إن هذا المجس قد اشتق من قطعة متكررة ترادفياً من جين مايوجلوبين الإنسان، إذ تقع هذه المنطقة في الأنترونة الأولى، وتتضمن أربع متكررات من تسلسل ذو 33 زوج قاعدي، على جوانبها 9 أزواج قاعدية (r) قد تم عزلها في قطعة 169-bp *HindIII* والتي تم إصلاح نهايتها وتضخيمها من خلال الكلونة في موقع *SmaI* للبلازميد pUC13 (c). إن الـ 33bp المتكررة أمكن عزلها بواسطة قطع المتكررتين الثالثة والرابعة بالإنزيم *AvaII* (A)، وأجري استبدال قاعدة مفردة في المتكررتين 1، 2 لإزالة هذا الموقع، وإنشاء موقع للـ *DdeI* (D) بدلاً منه (d). يتم لحم القطع 33bp بواسطة نهايات لاصقة من نوع *AvaII* غير متماثلة لإنتاج بوليمر (متعدد) رأس - ذيل. إذ تحتوي هذه البوليمرات ما يساوي أو أكبر من 10 متكررات يمكن عزلها بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الأجاروز، ويتم إصلاح النهايات واللصق في موقع *SmaI* للبلازميد pUC13 وتكون في بكتريا *E. coli* JM83 (e). ويلاحظ هنا في (e) أن البلازميد pAV33.7 يحتوي على 23 من المتكررات المكونة من أحاديات 33bp تقع ضمن قطعة 767 *BamHI* / *EcoRI*.

الفصل التاسع

تطبيقات وأبعاد

البصمة الجينية

الفصل التاسع

تطبيقات وأبعاد البصمة الجينية

بعض الاعتبارات الجنائية المتعلقة بالبصمة الجينية:

تدلُّ بصمات الأصابع التقليدية (الخطوط الجلدية) وبدقة على مُتهم ما، فيما إذا كان جانباً أم لا، شريطة وجود آثار لتلك البصمات في مسرح الجريمة، بحيث تُقارن تلك الآثار مع بصمة الشخص موضع الشك. وعليه فهي أداة للتعرف على الشخص نفسه، في حين نجد أن البصمة الجينية تخطي هذه العلاقة الضيقة، بحيث تُصبح دليلاً لإثبات النسب وصلات الرحم، الأمر الذي جعل منها وسيلة هامة في حزم قضايا أكثر شمولية كالهجرة والمفقودين والقضايا الجنائية كالزنى والسفاح واللواط والاعتصاب والقتل، والقضايا المُسجلة ضد الوسائل المستعملة من قبل المجرمين كالتضليل والتخفي وخلط الدماء بدماء حيوانات أخرى ولبس القفازات الواقية وقطع قنوات المني (Vasectomy) وإتلاف وتدمير جلد الأصابع... الخ.

لقد كان المدعو كولن بيتشفورك (في عام 1986) أول مُجرم في بريطانيا يُدينه بصمته الوراثية، بعد أن قتل فتاة في الرابعة عشرة من العمر. ومنذ ذلك الحين تسابقت الشركات التجارية ومكاتب مكافحة الجريمة والتحقيقات الجنائية والشؤون الاجتماعية في تطوير كفاءة ودقة بصمة الـDNA. فعلى سبيل المثال، اعتمد مكتب التحقيق الفيدرالي (Federal Bureau of Investigation) FBI على استعمال الإنزيم القاطع *HaeIII* في الحصول على RFLPs، وذلك لكون هذا الإنزيم يُعطي أنماطاً ثابتة من حزم الـDNA، كما أنه لا يتأثر بحدوث الميثلة في تسلسل الـDNA، وعليه يستبعد استعمال هذا الإنزيم الاختلافات الاصطناعية التي قد تنتج عن الميثلة المُعمّدة للـDNA أو الميثلة الطبيعية في أنسجة مُعيّنة.

ومن المختبرات العالمية التي اكتسبت شهرةً واسعة في هذا المجال مختبر ReliaGene، نظراً للدقة والثقة في الخدمات التي يُقدّمها لربائته على مستوى الأشخاص والمؤسسات أمام المحاكم المدنية والجنائية.

كما تتمتع الشركة الكيميائية العملاقة (The Giant Chemical Company) بفرعها البريطاني ICI (Imperial Chemical Industries)، والأمريكي Cellmark بحقوق بيع وتوزيع بعض المنتجات المتعلقة بالبصمة الوراثية، إذ يتوقع المسؤولون فيها جني أرباح تُقدّر بملايين الدولارات خلال فترة وجيزة. هذا وتُعدُّ شركتي Lifecode Corporation في نيويورك و Forensic Science Association في كاليفورنيا من أهم الشركات المنافسة للشركة أعلاه.

وبالفعل فإن التنافس في إجراء التحسينات على البصمة الجينية قد أعطى نتائج مُذهلة في القضايا الجنائية، ففي إحدى الحوادث التي أُحيلت من قبل قاضي التحقيق إلى مختبر البصمة الوراثية بسبب جريمة قتل حدثت بعد حادث اصطدام سيارتين انتهى بإطلاق النار من قبل أحد السائقين على الآخر، وهرب الجاني من الزجاجاة الأمامية المُحطّمة، ولكن أثناء خروجه علق بعض الشعر والدم منه على حواف الزجاج الحادة، ومن المفارقات في هذه الجريمة أن القاتل كان قد سرق السيارة من صاحبها الأصلي. وقد اتُهم صاحب السيارة بهذه الجريمة، ولكن إجراء البصمة الجينية بالاعتماد على الـ DNA المُستخلص من الدم والشعر العالق على حواف الزجاجاة الأمامية أثبت براءة صاحب السيارة.

هذا وتستطيع المرأة المُغتصبة في الولايات المتحدة الأمريكية وأوروبا مثلاً، والتي هي في شك من أبوية الجنين الذي في بطنها، هل يعود للمُغتصب الذي اعتدى عليها أم يعود للشريك الذي تُعاشره، من إجراء البصمة الجينية للجنين من خلال سحب عينة من السائل الأمنيوسي أو الزغابات الكورينية (راجع الفصل الثامن لمزيد من المعلومات)، ومقارنتها مع البصمة الجينية للشريك، وإذا ثبت كون الشريك ليس أباً لهذا الجنين، يُترك الخيار للأم في إبقائه أو إجهاضه.

وقد يسأل سائل ما هي جدوى إجراء البصمة الجينية في الوقت الذي قامت به بعض المحاكم بتبرئة المتهم رغم إدانته واثبوتة البصمة الجينية عليه وتجريمه ؟
وهنا نقول أن البصمة الجينية حالها حال غيرها من الأدوات العلمية التي قد يُساء استعمالها أو تفسيرها تحت معايير وأهواء وقناعات شخصية غير عادلة، كما حصل في قضية لاعب كرة القدم الأمريكية الأسود سمبسون (O. J. Simpson) الذي قتل زوجته في عام 1995 على اثر علاقتها مع شخص آخر، إذ أثبت اختبار البصمة الجينية للدم المأخوذ من سمبسون بأنه يتطابق مع البصمة الجينية للدم الموجود في مسرح الجريمة، ولكن محامي سمبسون كان يهدف إلى إبعاد هذا الدليل من قاعة المحكمة بحجة إمكانية تطابق بصمتي DNA لشخصين بنسبة $\frac{1}{1000000}$ وتحت معايير شخصية واعتبارات أخرى لهيئة المحلفين الذين كان غالبيتهم من السود، أطلق سراح سمبسون رغم القناعة الأكيدة بكونه قد قتل زوجته. لقد كان قرارهم على ما يبدو كرد فعل على ما جرى في حادث سابق عندما قتل شرطة أمريكيين بيض رجلاً اسوداً!

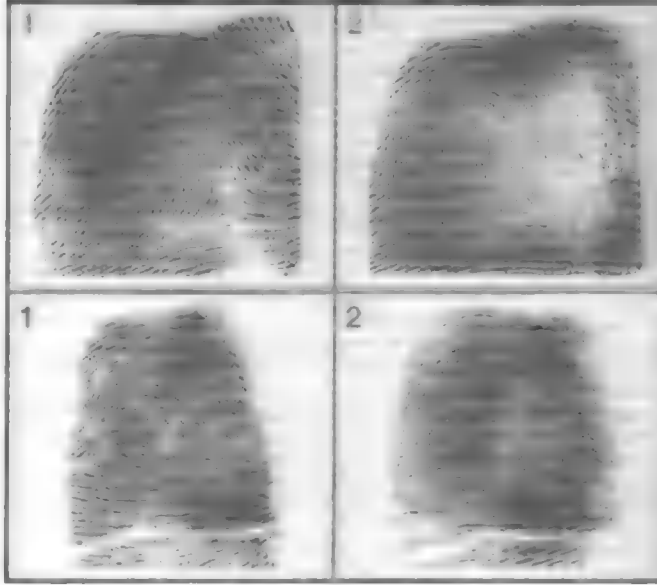
في الحوادث التي تشهد حرائق أو تفجيرات أو انهيارات مباني في الأماكن المزدحمة أو تحطم وسائل النقل كالطائرات والسيارات والبواخر، أو الرفات التي يتم العثور عليها في المقابر الفردية أو الجماعية، فضلاً عن بقايا أو أشلاء الجثث المتخلفة بسبب الحروب أو تلك الحوادث، نجد أن خبراء الطب الشرعي لا بُدَّ وأن يلجأوا إلى اختبار فحص الحامض النووي للتعرف على هوية تلك الجثث، إذ لا مناص هنا عن هذه التقنية بسبب اختفاء المعالم المظهرية والوصفية للدلالات والعلامات الفارقة الخاصة بالموتى.

لذلك لا بُدَّ وأن تلجأ دول العالم النامية إلى تطوير كفاءات ومختبرات مُخصصة في هذا المجال لتسهيل وحل الكثير من المشاكل المُستعصية.

العلاقة بين الطرق التقليدية والبصمة الجينية في كشف الجريمة:

إن من نعم الله التي لا تُحصى، هو وجود الخطوط الجلدية (Dermal ridges) (*)، وخصوصاً تلك التي تتشكل منها بصمات الأصابع (Fingerprints)، إذ ينطوي على وجودها فوائد عديدة، منها إحكام القبضة ومنع انزلاق الأشياء بعد مسكها باليد، من خلال زيادة قوة الاحتكاك مع تلك الخطوط، فضلاً عن إعجاز تفرّد أشكال البصمات في الأفراد بطريقة مُميّزة، وهي آية من آيات رُقي وكمال الخلق، حتى أن الله تعالى يذكر هذه القدرة الربانية على إعادة شكل الخطوط الجلدية في بصمة البنان بدقتها حين يبعث الخلق مرة أخرى بعد الموت ﴿وَيَحْسَبُ الْإِنْسَانُ أَلَّنْ نَجْمَعَ عِظَامَهُ﴾ (٢٠) بَلْ قَدِيرِينَ عَلَّ أَنْ تُسَوَّى بَنَانُهُ (٢١) (٣ - ٤)، فمن البديهي في علم الخطوط الجلدية (Dermatoglyphics) عدم تطابق شخصين حتى التوائم الصنوية في بصمات الأصابع التقليدية، كما هو موضح في الشكل (9 - 1)، إذ نلاحظ في الجزء (أ) من هذا الشكل تشابه نوع البصمة في التوائم الصنوية، وهي عروية كعبرية للتوأمين الصنويين، ولكن رغم هذا التشابه، فإن تفاصيل الخطوط الجلدية لبصمة التوأمين مختلفة، وهذه ميزة مهمة تفرّد بها بصمة الخطوط الجلدية على بصمة الـ DNA (شكل 9 - 2). ومن الممكن أن يزداد هذا الاختلاف بين التوائم غير الصنوية سواء في نوع البصمة أو تفاصيل الخطوط الجلدية (الجزء ب في الشكل 9 - 1).

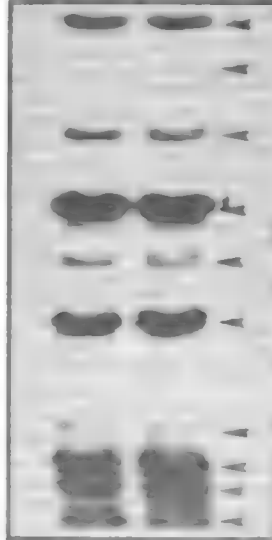
(*) ولمن يرغب بالإطلاع على الصفات الكمية (مثل TRC، ARC) والنوعية (أشكال البصمات) لهذه الخطوط في بصمات الأصابع وراحة اليد وأخص القدم، فهناك مصادر علمية كثيرة منها Cummins و Midlo (1976). ويُعدّ العالم العراقي أ. د. نصر فرحان عبد الله، أحد الباحثين البارزين في هذا المجال.



شكل (9 - 1). بصمة أصبع السبابة اليمنى (Right index finger)

أ. لتوائم صنوية (Identical twins): البصمة 1 و 2 عروية كعبرية (Radial loop).

ب. لتوائم غير صنوية (Non identical twins): البصمة 1 عروية زندية (Ulnar loop)، البصمة 2 مستديرة (Whorl).



شكل (9 - 2). تطابق بصمة الـ DNA للتوائم الصنوية

وتُعدُّ بصمات الأصابع دليل قوي جداً للإدانة، ولكن المشكلة هو عدم إمكانية الحصول دائماً على تلك البصمات من مسرح الجريمة، خصوصاً إذا لجأ المجرم إلى لبس القفازات أو مسح آثار البصمات من المناطق التي قام بلمسها أو أن تكون بصماته غير واضحة بشكل كافٍ، لذلك في مثل هذه الحالة لا بُدَّ من اللجوء إلى البصمة الجينية كبديل موثوق لحل مشكلات كهذه. ولتوضيح كفاءة ودقة هذه التقنية لنأخذ المثال الإحصائي الآتي: لنفترض أن بصمة الـ DNA للفرد عبارة عن كلمة وردت في كتاب في الصفحات 16 و 48 و 123 و 200 فإنه من غير المحتمل أن يوجد كتاب آخر ترد فيه هذه الكلمة في تسلسل هذه الصفحات نفسها، إذ إن ضم احتمال الكلمات الأربع سيكون مُميز للفرد، وهكذا الحال في بصمة الـ DNA لعلامات (Markers) الـ VNTR. ولترسيخ هذه الفكرة أكثر لنأخذ مثلاً آخر حول أوراق لعب الكارته، فلو قُسمت 52 ورقة لعب إلى أربع مجاميع حسب النوع (13 ورقة لكل مجموعة) (كوبة، سنك، ماجة، دنر)، وتم سحب ورقة من كل مجموعة، وكانت الأوراق المسحوبة نوع: ملكة كوبة، ملك سنك، 2 ماجة، 6 دنر. إن احتمالية تطابق سحب أربعة أوراق مرة أخرى بهذه الكيفية نفسها لتكوين مثل هذه التشكيلة تكون شبه مستحيلة وتساوي $\left(\frac{1}{13}\right)^4 = \frac{1}{28561}$. كذلك الأمر في كل علامة VNTR مُختارة لبصمة الـ DNA، فإنها تحدث بتكرار قليل مُميز في المجموعة السكانية، إذ إن ضرب الترددات لأربع علامات مختلفة يُعطي نموذجياً بصمة DNA بتردد يتراوح بين $\frac{1}{1000000} - \frac{1}{10000000}$.

وفي إحدى حالات الاغتصاب استطاع فريق المحققين الحصول على السائل المنوي من الضحية، وتم إجراء بصمة الـ DNA (عينة الدليل)، وقام رجال الشرطة بجمع المشتبه بهم، وبوشر بإطلاق سراح كل منهم لم تتطابق بصمته الجينية مع عينة الدليل، ما عدا شخص واحد حدث له تطابق، عند التحقيق معه، أشار الخبير العللي

إلى أن احتمالية التطابق مع شخص آخر هي بحدود 0.001% ($= \frac{1}{100000}$) في المجموعة السكانية. وعليه تعمل البصمة على استثناء 99.999% من المشتبه بهم خارج دائرة الاتهام. وعند تطبيق هذا النموذج مثلاً على استراليا التي يبلغ عدد سكانها 4500000، فإن إمكانية التطابق = 45 فرد في كل استراليا ($= \frac{4500000}{100000} = 45$)، ومن ثم إذا سكن فرد في قرية تعداد سكانها 3000، فإن تطابق بصمته الجينية مع شخص آخر تكون شبه معدومة.

لقد بدأ التطبيق الحقيقي الروتيني لبصمة DNA كأداة مهمة في الطب العدلي في عام 1988، إذ كان الفضل لهذه التقنية في تبرئة متهم أو إثبات جرمه، وأمكن تحقيق هوية أكثر من شخص بكفاءة عالية من خلال الإمكانات ودقة التمييز بين المجرم والبريء، ومن ثم فإنها تُعد وسيلة بديلة وناجعة لملاء الثغرات التي مُنيت بها الأساليب التقليدية المتبعة في التحقيقات الجنائية، وهنا لا نريد أن نُقلل من شأن الوسائل القديمة، ولكن تلك الوسائل يمكن أن تَحصر العدد إلى أقل ما يمكن، لتترك المجال لتقنية بصمة الـ DNA للتعامل مع أقل عدد ممكن من المتهمين. وهنا لا بُدَّ من الإشارة إلى الجريمة التي تمت في عام 1987 عندما قام شاب بارتكاب جريمتي قتل، وكانت الضحيتان، وهما مراهقتان، قد اغتصبتا أيضاً، وقد تبين بأن الحيوانات المنوية التي أُخذت من الضحيتين تعود للشخص نفسه، وقد كان الاقتراح بأخذ عينة من الحيوانات المنوية من كافة الرجال المتواجدين في هذه المنطقة، أي من 3300 رجل وإجراء بصمة الـ DNA، ولكن هذه العملية لا تخلو من الصعوبات، لذلك فقد ساعدت الطرق التقليدية في استبعاد 90% من هؤلاء وأصبح ممكناً تطبيق البصمة الجينية لما تبقى منهم، أي 330 رجل فقط.

وهنا لا بُدَّ من القول إن البصمة الجينية وسيلة كغيرها يمكن أن تحتاج إلى طرق مُكمّلة أخرى لتحقيق الهدف ضمن إطار مُحدّد. فعلى الرغم من تطوّر الطب العدلي في مجال تحديد عمر الوفاة للضحية، قد تتطلب الحاجة إلى تحديد الوقت الذي قُتل فيه الضحية من خلال بعض الحشرات، مثل ذبابة اللحم التي تضع بيوضها في داخل

جثث الحيوانات الميتة ومنها الإنسان، إذ يمكن من خلال معرفة عمر البقرات الفاقسة من البيض والمراحل اليرقية المتكوّنة داخل الجثة تقدير الوقت الذي ماتت فيه الضحية. وبالفعل فقد أفادت هذه الحشرات في تسهيل الحلول لبعض الجرائم التي تمت في الصحراء حيث تتواجد ذبابة اللحم المتحمّلة للظروف البيئية الصعبة، إذ إن هذه الحشرة لا تضع بيوضها إلا في النهار وليس في الليل، ولذلك تُفيد في تحديد وقت الوفاة للضحية!

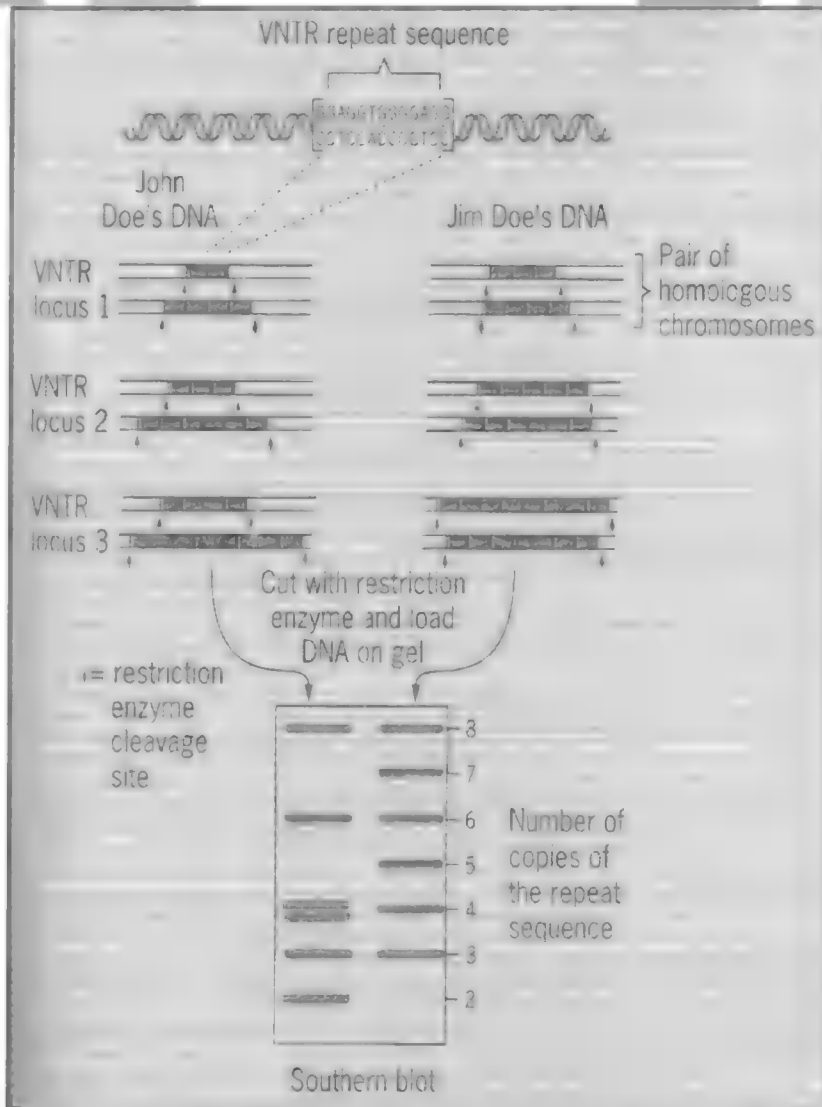
البصمة الجينية والقضايا العدلية:

بسبب العدد الكبير من التباينات في المادة الجينية للإنسان، فإن لكل منا هوية وراثية خاصة (مع استثناء التوائم الصنوية Identical twins)، لذلك فإن التباين الوراثي يمكن أن يستعمل لتحديد الأفراد بشكل أكثر دقة من الاستعمال التقليدي لبصمات أصابع اليد، وطالما أن الـDNA يمكن أن يوجد في أي عينة بيولوجية كالدم والنطف والشعر، كما يوجد أيضاً في الآثار التي تتركها بصمات الأصابع في مسرح الجريمة، ومن ثم يمكن الاعتماد عليها في كشف المجرم. إن هذا التباين الوراثي، وكما ذكرنا سابقاً، يمكن أن يزودنا بأدلة مفيدة في التطبيقات العدلية، كإثبات الأبوة والأمومة، والكشف عن هوية ضحايا الحوادث وقضايا الهجرة وغيرها. إذ إن استعمال الـVNTR والتابع الكروموسومي الدقيقة (STRs) المتكررة على عدد من الأليلات مهم جداً في إعطاء بصمة DNA محدّدة خصوصاً وأن من أهم إيجابيات هذه التقنيات الفعالة هي دقتها العالية، فعند فحص صورة التباين للفرد المطلوب تكون احتمالية وجود شخص بالصورة نفسها قليلة جداً، فإذا كانت الأليلات في العينتين (العينة المأخوذة من مسرح الجريمة والعينة المأخوذة من المشتبه به) متطابقة، فإن المشتبه به لا شك يكون متورّطاً. إن الأسئلة التي تطرح نفسها هي حول إمكانية وجود شخص آخر في المجموعة السكانية العامة يمتلك الأليلات نفسها ليكون موضع شك أمام

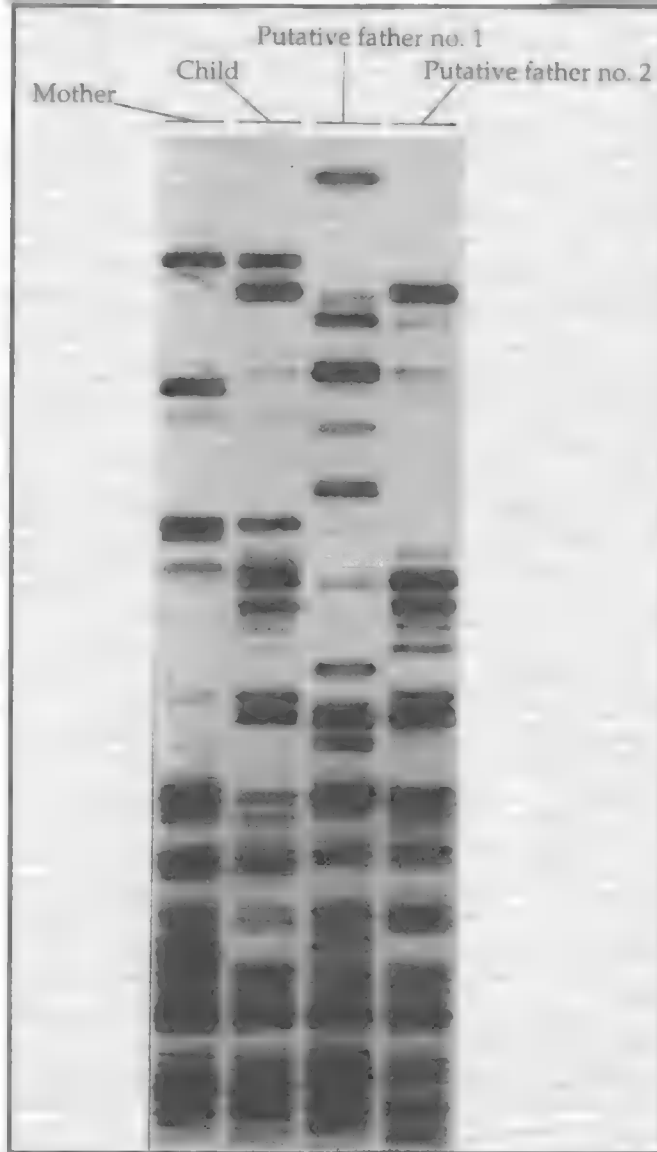
القاضي، وهل أن بصمة الـ DNA تدلّ على الشخص الخطأ؟ في حالات الجرائم تكون احتمالية الحصول على أليل يُطابق شخص عشوائي في السكان قابلة للحساب، خصوصاً وأن الدرجة العالية في التباير الأليلي في الـ VNTR والـ STR تفضي إلى احتمالية قليلة جداً لدرجة يمكن إهمالها. إن اعتماد طاقم من أربع مواقع للـ VNTR تزودنا بشكل نموذجي باحتمالية تطابق عشوائي بحدود 1 لكل مليون. أما استعمال مواقع أخرى فإنه يختزل هذه الاحتمالية إلى أقل من ذلك بكثير، فعلى سبيل المثال إن استعمال عدد من مجسات VNTR يزيد من دقة العمل بشكلٍ مُلفت للنظر، فإذا كان تردد الموقع 1 يُحدّد في $\frac{3}{28000}$ وتردد الموقع 2 يُحدّد في $\frac{1}{83}$ ، فإن مجموع تكرارهما يساوي ناتج ترددهما في الأفراد ويساوي $\frac{1}{28000}$ تقريباً، وطالما أن هذا التردد الكلي قد لا يُخدم كدليل إثباتي، لذلك نحتاج لمواقع أخرى، فإذا كان تردد الموقع $3 = \frac{1}{100}$ وتردد الموقع $4 = \frac{3}{25}$ ، إذ يساوي مجموع ترددهما 2500، في حين إذا اعتمد التردد الكلي للمواقع الأربعة، فإن احتمال أن يمتلك فرد آخر التوافق نفسه من الأليلات هو 1 لكل 70 مليون فرد، أي بحدود 4 أفراد في كل سكان الولايات المتحدة الأمريكية، وهذا احتمال صعب التحقيق، إن لم يكن مستحيلاً، ولذلك تُصبح الدقة عند استعمال المواقع الأربعة عالية جداً. إن البصمة الجينية توفر الدليل القاطع الذي يُمكن رجل القضاء من إصدار الحكم العادل تحت مفاهيم تشخيص المتهم علمياً، فإذا لم يتوفّر التطابق المقروض في هذه البصمة كان المتهم بريئاً. فقد أشارت البحوث الجينية على التجربة العلمية إلى وجود ما يقرب حالة من ثلاث حالات اغتصاب، كانت بصمة الـ DNA لديهم غير متطابقة مع عينة الإثبات، لذلك فإن هذه البصمة كانت مفيدة لأولئك الذي اتهموا خطأً، إذ طلب قاضي التحقيق تحويل عينات النطف المعزولة من مهبل الضحية إلى مختبر الهندسة الوراثية، ومُطابقة البصمة الجينية لها مع البصمة الجينية لعينة مأخوذة مباشرة من المتهم.

البصمة الجينية واختبار الأبوة (Paternity test) أو ادعاء النسب:

قديماً وفي حالة عدم التأكد من أبوة الطفل، يتم اللجوء إلى مقارنة فصائل الدم للطفل والأم والأب المحتمل، ولكن فصائل الدم يمكن أن تستعمل هنا لإثبات كون الرجل ذو فصيلة الدم المعنية هو ليس أب الطفل، ولكن البصمة الجينية لا تستثني فقط الأب الغير حقيقي، وإنما تُعطي تشخيصاً موجباً للأب الحقيقي، إذ يتم إجراء البصمة الجينية لعينات الـ DNA المتحصّل عليها من خلايا الطفل والأم والأب المحتمل، وعند مقارنة هذه البصمات لكل الحزم، فإن الحزم الموجودة في بصمة DNA الطفل يجب أن تكون موجودة في بصمتي الـ DNA لوالدي الطفل، حيث إن لكل زوج من الكروموسومات المتناظرة، يستقبل الطفل أحد هذين الكروموسومين من الأب والثاني من الأم. ولذلك يكون نصف حزم DNA الطفل تقريباً ناتجة من تسلسلات DNA ورثت من الأم، والنصف الآخر منها ناتجة من تسلسلات DNA ورثت من الأب. ففي الشكل (9 - 3) مثلاً يُلاحظ وجود تسلسلات VNTR في ثلاثة مواقع كروموسومية، وبعد تطبيق بصمة الـ DNA للأخوين Jim و John، أظهر Jim 6 حزم وهي (3، 4، 5، 6، 7، 8)، و John 5 حزم، (ملاحظة: الحزمة رقم 4 مُكرّرة، فتظهر كحزمة واحدة، ولكن للتوضيح رُسّمت بشكل حزمتين متقاربتين)، وهي (2، 3، 4، 6، 8)، إذ تطابق الأخوان في 4 حزم، وهي (3، 4، 6، 8). وفي الشكل (9 - 4) تم إجراء بصمة الـ DNA للأم والطفل والأبوين المزعومين المُشتبه بهما. في هذه القضية أثبتت البصمة الجينية بأن الأب المزعوم الثاني هو الأب الحقيقي للطفل. هذا ومن الجدير بالذكر هو إمكانية تواجد حزمة DNA في البصمة الجينية للطفل، وعدم تواجدها في البصمة الجينية للأب أو الأم، وهذا لا يعني أن هذا الطفل لا يعود لذلك الأب أو تلك الأم، إذ يمكن تفسير ذلك بحدوث طفرة وراثية (Mutation) أدت إلى وجود تلك الحزمة المختلفة.



شكل (9 - 3). مخطط مُبسَّط لاستعمال الـ VNTR في تحضير بصمات الـ DNA



شكل (9 - 4). بصمات DNA للأم وطفلها ورجلين كل منهما يدّعي بأنه الأب ولزيادة دقة البصمة الجينية في تشخيص علاقات الوالدين - الأطفال، فإنه يُفضّل زيادة عدد المجسات المستعملة في التهجين الجزيئي، إذ إنه باستعمال مجسات أكثر يمكن الحصول على تنوّعات أكثر (Polymorphisms)، وكذلك يمكن مقارنة نسبة

عالية من الجينومات للوالدين والأطفال، وعند ذلك يتم الحصول على نتائج تشخيص أكثر منطقية.

طبقاً للوثائق التاريخية، فإن العائلة الملكية الروسية المُمثلة بالقيصر نيكولاس الثاني (Nicholas II) وزوجته الإمبراطورة سارينا الكساندرا (Tsarina Alexandra) وأطفالهم الخمسة: ألكسز (Alexis)، أولكا (Olga)، تاتيانا (Tatiana)، ماري (Marie)، أنستازيا (Anastasia)، (شكل 9 - 5)، قد أُعدموا بتاريخ 16 جولي 1918 باطلاقات نارية من قبل جماعة أثناء الثورة البلشفية، ودُفِنوا في قبر مُفرد في جبال الأورال.



شكل (9 - 5). أطفال القيصر نيكولاس الثاني: (من اليسار إلى اليمين) ماري، تاتيانا، أنستازيا، أولكا، ألكسز

وفي عام 1920 تم انتحال امرأة اسمها فراولين (Fraulein Unbekannt) (أو آنا Anna Anderson Manahan كما عُرِفَت بعد ذلك)، من إحدى قنوات المياه وهي بحالة برودة مُفرطة، وقد ادّعت بأنها الدوقة أنستازيا رغم أنها لم تكن تتكلم الروسية. إن فراولين كانت مشدوّهة البال بخصوص تفاصيل حياة البلاط الروسي الملكي، وادّعاءها بأنها أنستازيا قد جوبه برفض شديد من قبل أقارب العائلة الملكية الروسية.

لذلك قام الغرنادوق المسؤول عن مدينة Hesse باستئجار مُتَحَرِّي خاص للتحري عن أصل آنا، وهل أن ما تدّعيه صحيح أم لا؟ لقد استنتج المُتَحَرِّي بأن آنا هي في الواقع فرانزيسكا (Franziska Schanzkowska)، ولكن الجدل بقي مستمراً. وعلى الرغم من أن القليل معروف عن فرانزيسكا، فهي وُلدت في الجزء الشمالي من ألمانيا، وعاشت في برلين خلال الحرب العالمية الأولى، وتعرضت لإصابة خطيرة نتيجة لانفجار في معمل الذخيرة الذي كانت تعمل فيه. بعد ذلك تم إدخالها في مصحاتين عقليتين للعلاج، ثم اختفت في عام 1920 في الوقت نفسه الذي تم فيه إنقاذ آنا من القناة في برلين وادّعت بأنها أنستازيا.

وبهدف الوصول إلى الحقيقة تم إقناع عمة أنستازيا البرنيسية آيرين (Irene) بمقابلة المرأة التي ادّعت بأنها ابنة أخيها، فهرت آنا وأخفت نفسها في غرفتها. إن تصرف آنا الغريب جعل من ادّعائها بأن تكون أنستازيا صعب التحقق منه، لذلك استمر الجدل حول شخصية آنا لمدة 70 سنة. هل كانت آنا فعلاً هي أنستازيا أم لا؟ إن المساندين لها مُصَرِّين على هذا الاعتقاد، وأنها فعلاً هي الدوقة، أما الغير مُصَدِّقين فقد استمروا على تأكيدهم بأنها ليست أنستازيا.

في عام 1979 اكتشف جيولوجي روسي قبر غير عميق يُعتقد بأنه يحتوي على بقايا رفات العائلة المالكة، وبسبب المناخ السياسي في الاتحاد السوفيتي في ذلك الوقت، قام هذا الجيولوجي بإعادة دفن الرفات. وبعد 12 سنة وعندما أصبح المناخ السياسي مناسباً، تم استخراج رفات الجثث والتحقق منها بواسطة مقارنة البصمة الجينية للـ DNA المُستخلص من الهياكل العظمية مع البصمة الجينية للأقارب الباقين على قيد الحياة، إذ تم إعادة النظر في الجدل حول شخصية آنا، وذلك بسبب اختفاء رفات جثتين، وهما جثة أنستازيا وأخيها ألكسر. والسؤال المطروح هل تمكّنوا من الحرب من الإعدام أم ماذا؟ وعلى الرغم من عدم وجود إجابة حتمية لهذا السؤال حتى الآن، إلا أن نتائج بصمة الـ DNA تدلّ على أن آنا هي ليست الدوقة أنستازيا.

لقد توفيت آنا في عام 1948 بعمر يناهز 83 سنة، ولكن خلال عملية أُجريت لها في عام 1979 في مستشفى Martha Jefferson في مدينة Charlottesville ولاية

Virginia، تم إزالة نسيج من الأمعاء وتثبيتته بالفورمليدهايد وحفظه في كتلة من شمع البرافين، وكذلك تم حفظ عدد قليل من بصيالات شعر أنا. وعليه أمكن إجراء اختبارات الـ DNA التي تضمنت دراسة تسلسلات الـ VNTR والتسلسل النيوكليوتيدي للمناطق الغير مُشفرة لـ DNA المايٹوكوندريا لنسيج الأمعاء وبُصيالات الشعر المحفوظة، وكذلك على عينات DNA دم أقرباء فرانزيسكا والعائلة الملكية. إن هذه الاختبارات أُجريت باستقلالية تامة في ثلاثة مختبرات مختلفة، وهي:

1. مختبر تشخيص الـ DNA للقوات المسلحة في الولايات المتحدة.

2. مختبر خدمات العلوم الجنائية في بريطانيا.

3. مختبر قسم الأنثروبولوجي في جامعة بنسلفينيا.

لقد دلت النتائج التي تم الحصول عليها من هذه المختبرات الثلاثة على أن أنا لم تكن هي أنستازيا، وفي حقيقة الأمر أثبتت بقوة أن أنا كانت فرانزيسكا. ومن خمس VNTRs مختلفة تم فحصها، لوحظ بأن أربع منها لم تكن متوافقة مع احتمالية كون أنا هي ابنة القيصر نيكولاس الثاني. كذلك أثبتت عملية مقارنة تسلسل الـ DNA بأن أنا لم تكن لها صلة قرابة مع العائلة المالكة، وبدلاً من ذلك أكدت معلومات التسلسل النيوكليوتيدي على أن أنا كانت هي فرانزيسكا، وعند المواقع الستة المتغيرة الموضحة في الجدول (9 - 1) لـ DNA المايٹوكوندريا، يُلاحظ احتواء هذا الـ DNA على النيوكليوتيدات نفسها الموجودة في DNA كارل ماوتشر (Carl Maucher) وهو ابن ابن أخت فرانزيسكا، واختلف عن التسلسل الموجود في DNA دوق مدينة أدنبرة وهو ابن ابن أخت سارينا الكساندرا. وهكذا ساهمت البصمة الجينية في إمطة اللثام وحل لغز مُعقد لقصة مثيرة كهذه القصة.

جدول (9 - 1). النيوكليوتيدات المتغيرة في DNA المايٹوكوندريا

الموقع :	1	2	3	4	5	6
Anna Anderson Manahan (أنا)	C	C	T	T	C	T
Carl Maucher (ابن ابن أخت فرانزيسكا)	C	C	T	T	C	T
(ابن ابن أخت الكساندرا) دوق أدنبرة	T	T	C	C	T	C

وفي عام 1989 عُثر على بقايا هيكل بشري في إحدى الغابات في الولايات المتحدة الأمريكية، إذ تم استخلاص الـ DNA من الخلايا العظمية للهيكل، وقورن مع الأدلة المقدمة من أهالي الأطفال المفقودين، وتبين من خلال تحليل البصمة الوراثية بأن الهيكل يعود لطفلة مفقودة منذ سنوات.

كما تمكن الأطباء الشرعيون في عام 1992 من تحديد الهوية الوراثية لقائد عسكري مفقود منذ الحرب العالمية الثانية، من خلال عثورهم على بعض الهياكل البشرية أثناء جرف أرض المعسكر في إحدى الولايات المتحدة الأمريكية، إذ أمكن التعرف على هذا القائد من خلال أخذ عينات دم من والدته وأولاده، ومقارنة بصمة الـ DNA لتلك العينات مع بصمة الهياكل العظمية المعثور عليها.

تطبيقات البصمة الجينية في الكائنات الأخرى:

تعد البصمة الجينية أداة بحثية قوية يمكن استعمالها للكائنات الأخرى، مثل القطط والكلاب والطيور والنباتات والكائنات الدقيقة وغيرها، كما أنه من الممكن استعمالها في مجال حل المشاكل البيئية التي دُرست سابقاً بالطرق التقليدية، ومن المتوقع أن يتسع استعمال علم البيئة الجزيئي ويكون له تأثير هام في دراسة الكائنات تحت الظروف البيئية المختلفة.

في عام 1980 تمكن Singh وجماعته من عزل DNA التوابع الكروموسومية الحاوية على التسلسلات المتكررة GATA و GACA والمُسماة BKm sequences من إناث أفاعي الكريت المُحزّمة (Banded krait snake)، والتي استعملت كمجسات في تقنية الـ RFLPs لتحديد الجنس في كثير من الحيوانات كالطيور، لقابليتها على التهجين مع تسلسلات كروموسوم W، وحشرة ذبابة الفاكهة، لقابليتها على التهجين مع كروموسوم X، والفئران، لقابليتها على التهجين مع كروموسوم Y. كما استعملت في تحقيق بصمة الـ DNA لبعض أنواع الأسماك، وذلك لقابليتها على التهجين مع بعض تسلسلات الكروموسومات الجسمية فقط وبصورة مُتغايرة.

كما كان لتطبيق بصمة الـ DNA دوراً فعالاً في الدراسات التصنيفية للمراتب التصنيفية المختلفة والتطورية للكائنات الحية المتنوعة، الأمر الذي انبثق عنه ما يُسمى

بعلم التطور الجزيئي (Molecular evolution). فقد استعمل مثلاً المجس المحضّر من قبل جيفري وجماعته (1985) في التهجين مع DNA مايكوكوندريا الحيتان، واثبت كفاءة عالية في التمييز بين أفراد النوع الواحد، لذلك فقد استعملت تقنية الـ RFLPs في دراسة حياتية هذه الحيوانات وعلاقاتها التطورية، فضلاً عن متابعة هجرتها. وقد استعملت البصمة الجينية في دراسة العلاقة التطورية بين الفيل الحديث والماموث المكسو بالصوف الذي كان يعيش في أمريكا الشمالية وآسيا وأوروبا قبل آلاف من السنين الماضية. فقبل بضع سنوات تمّ العثور على صغير ماموث مات منذ 40000 سنة مضت وتجمّد في سيبيريا، إذ حُفظت أنسجته بشكل جيد في الثلج، الأمر الذي مكّن من استخلاص الـ DNA وإجراء البصمة الجينية للماموث ومقارنتها مع البصمة الجينية للفيل الحديث، وبالفعل أثبتت العلاقة التطورية بينهما.

ولا يخفى على القارئ تطبيقات البصمة الجينية في مجالات الإنتاج الحيواني والنباتي من ناحية تمييز الضروب والأنواع والأجناس المتميّزة في صفة إنتاجية مُعيّنة، كإنتاج البيض أو الحليب أو اللحم أو بروتين نباتي مُعيّن، فضلاً عن دراسة وتطبيق الهجن والأصناف النباتية في أعمار مُبكرة أو متقدمة.

أمثلة على حوادث طبّقت فيها البصمة الجينية في كشف أسرار الجريمة:

اعتدى شخص عام 1989 في الولايات المتحدة الأمريكية على فتاة اسمها لوسي، بعد أن وضع عصابة قماش على عينيها، ولم ترّ وجهه، وقام باختطافها من غرفة نومها ذات الشباك القريب من الشارع. وعندما حضر الشرطة وجدوا بالقرب من سرير نوم الفتاة محفظة رجالية تخص الشاب مايكل جيرو، وهو مصور أعراس مُحترف، ويُعرف عنه اللطف والأخلاق المُهذّبة، وقد قام سلفاً بإبلاغ الشرطة بأن محفظته قد سُرق. وبعد التحقيق اعترف بأنه اغتصب لوسي، وقال بأنها المرة الأولى التي يقوم فيها بعمل كهذا عندما مرّ في الشارع ونظر من الشباك ورأى فتاة عارية راقدة في فراشها. وقد حُكم عليه بالسجن لفترة قصيرة، وخلال فترة السجن قام ببيع منزله، إذ وجد النزلاء الجدد محفظة غريبة مُخبأة في الطابق السفلي، فيها وثائق تُثير الريبة والشك، لذلك قاموا بتسليمها للشرطة. قام المحقق المُكلّف بمتابعة المعلومات المذكورة في تلك الوثائق،

بمتابعة الأسماء المدونة في المحفظة، ومن تلك الأسماء الفتاة لوسي. لقد أخبرت لوسي المحقق بأن شخصاً اعتدى عليها جنسياً بعد أن هددها بمقص ووضع عصا على عينيها وهمس في أذنها بأنه سوف لن يؤذيها إذا أذعنت له، وبعد الاعتداء أجبرها على الاستحمام.

لقد كان مايكل جيرو يسكن في هاي بارك من الفترة 1983 - 1986 مع صديقه آني. وفي عام 1990 حدثت جريمة اعتداء جنسية على مربية فرنسية في هاي بارك أيضاً. ومع أواخر عام 1992 تزايدت الشكوك حول مايكل جيرو بأنه هو المسؤول عن اعتداءات هاي بارك، وبعد إطلاق سراحه وُضع تحت المراقبة، إذ لوحظ بأنه يعيش حياة طبيعية ويبحث عن عمل. وخلال ذلك تابعت الشرطة التحقيقات حول الاعتداءات السابقة في هاي بارك، خصوصاً وأن الفتيات اللواتي أُعتدي عليهن جنسياً ذكرن الرواية والأسلوب نفسيهما: توضع على أعينهن عصا ويتم اغتصابهن، ثم يُجبرن على الاستحمام لإزالة أي أثر للسوائل البيولوجية.

وفي عام 1993 تم تأسيس مختبر لإجراء بصمة الـDNA، وما شجع ذلك المبدأ القائل بأنه لا يمتلك أي شخصان الحامض النووي ذاته باستثناء التوائم الصنوية.

المهم في هذا الأمر بأن الشرطة قامت باعتقال مايكل جيرو مرة أخرى وربطه على جهاز كاشف كمحاولة لكشف الجريمة، وأثناء عرض مشاهد لحالات اغتصاب مُعينة، لوحظ بأنه يرتبك بشدة، ومن خلال السجلات التي تتعلق به، تبين بأنه يسترى النظر من فتحات الأبواب والشبابيك، كما تبين بأنه سبق وأن شوهد في مجمع هاي رايز الذي حدثت فيه حوادث كسر للأبواب. كما أن صديقة مايكل جيرو أخبرت المحققين بأنها عثرت في منزله على حقيبة تحتوي صور لنساء عاريات بعد أن تم ربطهن بالحبال، وذكرت بأنها تشاجرت معه بسبب تلك الصور. لقد حصل المحققون على مذكرة تسمح بتفتيش غرفة مايكل جيرو، إذ كانت الغرفة بأبعاد 10 x 12 قدم، وعثر فيها المحققون على خزانة فيها حقيبة تحتوي على صور خلية وأشرطة فيديو ودفترتي ملاحظات مُدوّنة فيها 33 حالة اغتصاب.

قامت الشرطة بإحضار الأدلة المحتفظ بها لتلك الـ 33 حادثة، سواء من السراويل المُلطَّخة بالسائل المتوي أو من عينات اللعاب، واستخلاص ومطابقة الـ DNA مع DNA مايكل جيرو، إذ أظهرت نتائج الفحص تطابق بصمة DNA مايكل جيرو مع 4 من العينات الـ 15 الصالحة للتحليل (من ضمن 33 عينة)، لذلك اعترف بأنه كان من الساعة 7 مساءً حتى الفجر يقوم بمراقبة الشبايك، ثم يُحطِّط للجريمة وينفّذها، ويُجبر النساء على الاغتسال. وقد حُكم عليه بالسجن لمدة 25 عاماً.

وفي عام 1995 وقعت حادثة اعتداء جنسي في داخل نفق بالقرب من أحد المتنزّهات في مدينة تورنتو بعد دخول إحدى الفتيات واسمها سنيثا إلى هذا النفق، ولم تتمكن الشرطة إلاّ من أخذ لعاب المجرم الناجم عن تقبيله للفتاة، إذ أرسل إلى المختبر لاستخلاص الـ DNA منه وإكثاره بالـ PCR. وبعد فترة تكرر الحادث من قبل المجرم نفسه وفي المكان نفسه، على ضحية أخرى اسمها مري آن، إذ تمّ جمع السائل المنوي للمجرم من جسم مري آن وإرساله إلى المختبر أيضاً. وقد بيّنت النتائج تطابق بصمته الـ DNA لعينتي اللعاب والحيوانات المنوية، وأنها تعودان للشخص المعتدي نفسه. وعليه توجّه الشك نحو شاب أسود عمره في أواخر العشرينيات، نشاطه محدود في تلك المنطقة الجغرافية الضيقة.

طلبت الشرطة من الفتاتين مساعدة المتخصص برسم الصور على الأوصاف بعد أن قامت الفتاتين بوصف شكل الجبهة والحواجب والعيون والأذنين والشعر (أو أي جزء بارز من الوجه)، إذ تُجمّع الصورة فيما بعد على جهاز كومبيوتر، ويتم من خلال برنامج خاص بالكومبيوتر وضع حاجز مثل المنديل على الصورة لمحاكاة الحقيقة، ثم يُطلب من الضحيتين الشاهدين المقارنة. ولكن المشكلة هنا مع من تتم مطابقة بصمة الـ DNA، إذ لا يوجد مصدر مُشْتَبِه به للمطابقة إلى بعد القبض على المُشْتَبِه بهم للتأكد.

بعد يومين من وقوع حادث الفتاة مري آن تمّ إلقاء القبض على مراهق أسود اسمه فرانك سويني له الموصفات نفسها، وقد ادّعى بأنّه بريء. وبعد اختباره باستعمال جهاز كشف الكذب أخفق في الفحص بعد 10 ساعات من الاستجواب، واعترف باقترافه لتلك الجريمة، ولكنه أنكر ذلك بعد الاجتماع بالمحامي.

لذلك تم أخذ عينة دم منه، وطلب من عائلة الأحياء كيم جونستن تحليل بصمة الـ DNA له. وبعد أيام قالت كيم جونستن بأنه ليس هو المجرم، وعليه أطلق سراحه، وعادت التحقيقات من جديد، وتم نشر قوات لتمشيط المنطقة حول المتنزه، وقد باءت تلك المحاولات بالفشل الذريع.

وفي منطقة أخرى قريبة، كانت امرأة عائدة من محطة باص وقام رجل بإمساكها من الخلف وتسليط سكينه على عنقها، ولكن أحد الجيران شاهد ذلك المنظر، واضطر المجرم إلى الهرب. لذلك تعقدت المشكلة أكثر، لأن المجرم يقوم بتغيير المناطق التي يزاول فيها نشاطه. وبعد أسبوعين حصل هجوم آخر على فتاة في المتنزه القديم، وبعد 6 أشهر تلقت الشرطة اتصال هاتفية من امرأة تعرضت لاعتداء اسمها جبريل بعد أن أرسلت إشارة إلى خارج المنزل للسائق الخاص بها، فدخل السائق وقبض على المعتدي المسمى لويس الذي قام بالإنكار. أطلقت الشرطة سراحه وبوشر بمراقبته من قبل المحققين، وطلبوا منه أخذ عينة دم لفحص الـ DNA فرفض ذلك، الأمر الذي اضطرهم لتفتيش منزله، إذ وجدت مذكرات فيها خطط للاعتداء على النساء، كما وجدوا خرائط لمواقع تلك الاعتداءات. وبعد أخذ عينة دم منه وإرسالها إلى المختبر، أثبتت عائلة الأحياء كيم جونستن بعد يومين تطابق بصمة الـ DNA هذه مع بصمة الـ DNA للأدلة المتوفرة من الاعتداءين الذين تمّا في المتنزه. لذلك اعترف المجرم بتلك الاعتداءات وحُكم عليه بالسجن 10 سنوات، ولكنه لم يعتذر عن تلك الجرائم!

كما وأود الإشارة هنا إلى حادثة طريفة، سُميت شجرة الساق الأخضر المبلغ (الواشي)، وهي واحدة من الأحداث الجنائية المثيرة لاستعمال بصمة الـ DNA، إذ لم تتضمن هذه الحادثة DNA المشتبه به وإنما DNA نباتات تنمو في موقع الجريمة. ففي مساء الثاني من شهر مايو لسنة 1992 خُنقت امرأة من منطقة Phoenix وأُخفيت جثتها بالقرب من مصنع مهجور. وقد عثر المحققون على جهاز مناداة بالقرب من الجثة، وهذا يجعل من صاحبه المشتبه به الأولي في هذه الجريمة. وعندما استجوبوا الرجل اعترف بأنه كان مع المرأة في اليوم الذي وقعت فيه الجريمة، وادّعى أن ذلك لم يكن بالقرب من المصنع، وأن المرأة يجب أن تكون قد سرقت الجهاز من الشاحنة. إن البحث

الذي قام به المحققون بخصوص الشاحنة أعطى مفتاح الحل لهذا اللغز، فقد عُثر على قرنين لبذور شجرة الساق الأخضر Palo verde.

تنمو شجرة Palo verde (*Cercidium floridum*) بشكل طبيعي في الأراضي الجنوبية الغربية، وتعود لعائلة الفاصوليا، ومن أجل تكييفها مع الظروف البيئية الحارة والجافة تُكوّن أوراقاً صغيرة جداً. وللتعويض عن كمية الكلوروفيل المحدودة في الأوراق الصغيرة هذه تُصبح سيقانها خضراء، وتقوم بالتركيب الضوئي. وهذا يُعطي النبات اسم Palo verde والذي يعني بالأسبانية الساق الأخضر. إن هذه الشجرة لا تُشابه نبات الفاصوليا في بعض النواحي، ولكنها كأبي نبات فاصوليا نموذجي تُكوّن بذور ضمن قرون تسقط على الأرض عند نضجها.

تساءل المحققون عن إمكانية إثبات كون قرون البذور الموجودة في حوض شاحنة المُشتبه به قد سقطت من أشجار الساق والأخضر في المكان الذي وُجدت فيه الجثة، فإذا كان كذلك فإنه سيكون الدليل حول مكان المُشتبه به من موقع الجريمة. ولكن كيف يتم تحقيق ذلك؟ استعان المحققون بالدكتور Timothy Helentjaris في جامعة أريزونا، إذ قام بتحديد إمكانية تطابق الـ DNA للبذور من حوض الشاحنة مع أي من أشجار الساق الأخضر بالقرب من مكان الجريمة، إذ عدّ هذا التطابق من الأهمية، لذلك عليه أولاً أن يُبين أن نبات الساق الأخضر يختلف وراثياً عن غيره من الأشجار القريبة، والا سوف لا تكون البذور كدليل لهذه الشجرة بحدّ ذاتها. ولحسن الحظ وجد تبايناً كبيراً في نمط الـ DNA بين أشجار الساق الأخضر. لقد أخذ Helentjaris قرني البذور من شاحنة المتهم وقارنها مع بذور قرون من 12 شجرة ساق أخضر جُمعت من جوار المصنع، إذ إن المحققين يعرفون أي من الـ 12 شجرة هي المفتاح، والتي تمثل موقع الجريمة، ولكنهم لم يُجربوا الدكتور Helentjaris بذلك، والذي قام باستخلاص الـ DNA من البذور لكل قرن، وتم تطبيق تقنية RAPD باستعمال بادئ مُضخّم يُعطي بحدود 10 - 15 حزمة DNA مُميّزة، إذ إن نتائج هذه التجربة المُتحكّم بها غير قابلة للخطأ. أظهرت النتائج بأن صورة الـ DNA

من إحدى القرنات الموجودة في حوض الشاحنة تتطابق بشكل دقيق مع واحدة فقط من الـ 12 لأشجار الساق الأخضر التي تم جمعها، وكانت قريبة جداً من مكان الجثة. وفي اختبار إضافي آخر مهم، أثبت Helentjaris بأن صورة الـ DNA هذه تختلف عن قرنان مجمعت من 18 شجرة أخرى تقع في مكانات عشوائية حول منطقة Phoenix. إن تحليل كل العينات أفضى إلى تقدير احتمالية التطابق العشوائي لأقل من 1 في 1000000، وهي نسبة ممتازة وعلى درجة عالية من الدقة.

لقد قُدمت هذه النتائج كدليل إدانة قوي في المحكمة حول مكان المُشْتَبِه به في مسرح الجريمة. وبعد انتهاء 5 أسابيع من المحاكمة، كانت قد وُجِّهت إلى المُشْتَبِه به تهمة القتل كمجرم من الدرجة الأولى، وأدين بعد استئنافه للحكم، وحالياً يقضي عقوبته في السجن مدى الحياة.

الفصل العاشر

الضوابط القانونية وبناء البنوك

المعلوماتية للبصمة الجينية

الفصل العاشر

الضوابط القانونية وبناء البنوك المعلوماتية للبصمة الجينية

هنالك بعض الضوابط والشروط يجب أن تخضع لها البصمة الجينية بهدف تطبيقها، إذ لا بُدَّ وأن تخضع البصمة إلى معايير فراي كيلي (Frye Kelly standards)، وتشترط هذه المعايير ما يأتي:

1. أن يكون الأسلوب العلمي الحديث مقبولاً لدى الأوساط العلمية المختلفة، وأن تكون صلاحية التجربة قد أثبتت قبل إدخاله في حيز القضاء.
2. ارتباط هذا الأسلوب العلمي الحديث مباشرة بالقضية بحيث يستند إليه رجال القانون في مُرافعاتهم دون التعدي على الحقوق الشخصية. فالمعلومات ذات الصلة بالبصمة الجينية يمكن حفظها واسترجاعها عند الحاجة، لذلك لا بُدَّ من وجود ضمانات لعدم إساءة استعمال هذه المعلومات المأخوذة من الأشخاص المُختبرين لأغراض لا تتعلق بالقضية تحت المداولة. لذلك يقترح دُعاة الدفاع عن حقوق الإنسان إتلاف العينات والمعلومات بعد استيفاء الهدف الرئيسي منها، أو تخزينها بحيث لا يُسمح لغير المُخولين الإطلاع عليها.

بسبب دقة البصمة الجينية، فإن مكتب التحقيق الفيدرالي FBI أسس بنوك للبصمات الجينية اعتمدت على 3 - 4 تغايرات قد تمَّ تحديدها في المجاميع الأثنية التي أعطت بصمات DNA مُتميزة مقارنةً مع بصمات DNA لأفراد غير مُحددي العرقية، وقد تمثّلت هذه المجاميع الأثنية بالسود (Black) والقوقازيين (Caucasian) والهسبانك (Hispanic) قاطني أمريكا اللاتينية).

ونتيجةً للتغاير الملاحظ في عروق إضافية أخرى، فإن الأكاديمية الوطنية للعلوم (National Academy of Sciences) قد أوصت بإجراء البصمة الجينية لـ 100 فرد

يُمثلون 15 - 20 مجموعة سكانية، والتي استعملت لتجميع مكتبة جينية أكبر، إذ إن هذه المكتبة لازالت مستمرة في التطور وسوف تتعزز بنظام بنكي للمعلومات.

فضلاً عن ذلك فقد بوشر بتنفيذ تشريعات في 26 ولاية أمريكية للسماح بجمع عينات الدم وأحياناً اللعاب، وكذلك بصمات الأصابع وبصمات الإبهام (Thumbprints) لتشخيص المساجين، إذ يتم إدخال بصمة الـ DNA لكل سجين في بنك المعلومات، وقد بوشر بتوحيد استعمال طاقم من المجسات والإنزيمات في دراسة بصمات الـ DNA من قبل الـ FBI والذي أطلق عليه اسم نظام تشخيص الـ DNA الموحّد CODIS (Combined DNA Identification System)، ويتضمّن هذا النظام نقل المعلومات بين بنوك مختلفة. وفي المجموعة الأوروبية أسس نظام معلومات آخر أطلق عليه EDNAP وهو يعتمد على تقنية الـ STR باستعمال أجهزة فاحصات أو ماسحات الجينات (Gene scanners).

وفي عام 1994 عملت وكالة خدمات العلوم الجنائية FSS (The Forensic Science Services) في بريطانيا، والتي تُعدّ الأولى في العالم، على تجميع وإدخال المعلومات ضد الجريمة، بتطبيق جيل جديد من التحاليل المتعلقة بالـ STR، والذي أطلق عليه نظام SG، كما تمّ إدخال فحص حديث آخر هو TGM. وتقدّم المختبرات العلمية هذه الوكالة خدمات واستشارات ودورات تدريبية على مختلف المستويات لمؤسسات مختلفة في أكثر من 60 دولة في العالم.

هذا ويتم جمع أغلب العينات في الولايات المتحدة من خلال المحاكم القضائية أو المؤسسات الإصلاحية والجهات التنفيذية من الشرطة والـ FBI، ومن ثمّ حفظها وتحليلها وإدخالها في بنك المعلومات، إذ تتضمّن المعلومات المسموح بها بصمات الـ DNA للمُدانين فقط، وليس بصمات الـ DNA المُتحصّل عليها خلال التحقيقات المتعلقة بالجريمة. إذ يتم حفظ هذه العينات ووضع علامة عليها مع اسم المُذنب ورقم الضمان الاجتماعي وتاريخ الميلاد والعرق والجنس واسم الشخص الذي قام بجمع العينة وتاريخ ومكان الجمع. ويجب نقل العينة إلى المختبر خلال فترة لا تتجاوز 15 يوماً. كما أن هنالك استمارة يجب ملئها تشتمل على معلومات تتضمّن اسم الشخص

المستلم للجنة وتاريخ الاستلام ووثيقة موقعة تؤكد عدم التلاعب بالحاوية، ثم يتم تقسيم العينة وتعليمها وتخزينها.

إن التلاعب بالعينات يُعدّ جريمة يعاقب عليها القانون، وأن تسرّب أية معلومات تعود لشخص ما بدون إذن يُعدّ مخالفاً للقانون. كما لا يُسمح للمجرم أو للمحامي بالقيام باختبار مُستقل على العينات، ولا يُسمح للمتهم أيضاً بأن يبحث عن المعلومات في البنك بنفسه.

لقد كان لبناء البنوك المعلوماتية لبصمة الـ DNA (DNA data banks) فائدة كبيرة من خلال مطابقة بصمة DNA المتهمين مع قاعدة المعلومات البنكية، إذ أوضحت إحصائيات مكتب العدل (Bureau of Justice Statistics) في عام 1989 بأن 62.5٪ من السجناء الذين تم إطلاق سراحهم قد تم اعتقالهم مرةً أخرى، بسبب ارتكابهم جرائم أو مُحالفات أخرى في أقل من 3 سنوات، وأن مرتكبي الاغتصاب الجنسي الذين يتم إطلاق سراحهم هم عرضة للاعتقال مرةً أخرى باحتمالية 10.5 مرة بسبب جرائم الاغتصاب. كما أن الأشخاص المتورطين في القتل أو القتل المُتعمّد هم أكثر احتمالاً من غيرهم للعودة إلى السجن. لذلك أكّد الـ FBI على أن إنشاء مثل هذه البنوك سيُسَهّل كثيراً في عمل التحقيقات الجنائية.

هذا وعملت وزارة الدفاع الأمريكية على إصدار تعليمات تخص جميع المُلتحقين الجدد بالجيش تؤكد على ضرورة أخذ عينات من اللعاب والدم، لإجراء بصمة الـ DNA هؤلاء الجنود، ويجب أن يتم ذلك حتى ولو تعرّض الجندي للقتل أو للحرق. وقد صدر قانون في عام 1993 يؤيد الثقة والأهلية للبنوك المعلوماتية لبصمة الـ DNA شريطة أن تُراعي اعتبارات ضبط الجودة والمعايير الاختبارية التأكيدية.

وفي تعديل حديث على قوانين الهجرة، شرّعت فرنسا في شهر سبتمبر لسنة 2007 قانوناً يُلزم المهاجرين وطالبي تأشيرة الدخول إليها بالخضوع لفحص الحامض النووي، وتحديد البصمة الجينية لكل فرد، وذلك للحدّ من هجرة المهاجرين غير الشرعيين.

كما وتعتزم عدد من دول العالم المتقدمة، كالولايات المتحدة الأمريكية وفرنسا، وضع البصمة الجينية على جوازات السفر للمواطنين، للاستفادة منها عند حصول حوادث مُعَيَّنة في تحديد هوية هؤلاء الأفراد.

الفصل الحادي عشر

دراسة مسرح الجريمة

الفصل الحادي عشر

دراسة مسرح الجريمة

إن دراسة مسرح الجريمة يُعدُّ موضوعاً في غاية الأهمية، خصوصاً وأنه يُبرمج لنا مهام التحرك الزماني / المكاني نحو عينة DNA تُستخلص وتؤخذ من مصدرها المناسب، كما أنه يُمكن في النهاية من استنباط السيناريو المحتمل لكيفية حصول الوفاة (حادث أو انتحار أو قتل) وذلك عن طريق المقارنات الموضوعية مع نتائج الفحص التشريحي، وتحليل المختبر الجنائي.

فحص موقع الجريمة

يُعدُّ فحص موقع الجريمة من أهم مفاتيح الحل، خصوصاً وأن جثة المجرم عليه قد تكون تعرّضت للحادث في مكان ما، ثم نُقلت إلى مكان آخر، بفعل فاعل أو المجرم عليه نفسه. فمثلاً يُطعن شخص ما بجرح نافذ عميق، أو تلتهب النار بملابسه، فيجري لمسافة معينة قبل أن ينهار، أو يخرج من بيته هلعاً بعد أن تناول كمية كبيرة من دواء أو مادة سامة أو جرعة مخدرات، ثم يلقي حتفه. وقد دلت الدراسات على أن ما يقارب 26٪ من الأماكن لا يكون فيها مكان الجثة هو موقع الجريمة الحقيقي.

وهنا لا بُدَّ من الإشارة أيضاً إلى عامل الزمن، أي الوقت الذي استغرق بين لحظة الوفاة ولحظة اكتشاف الجريمة. وهذا قد يتم فيه أيضاً نوع من الخداع والتمويه، فقد يتعرّض شخص لضربة قاتلة على الرأس يعيش بعدها أياماً أو أسابيع، ثم يموت في أي مكان جزاء نرف تدريجي في الدماغ. وفي الحوادث التالية بعض التوضيح.

في مدينة البيضاء (ليبيا) قام شخص حدّاد (عراقي الجنسية) بقتل صاحب متجر كهربائيات ضخم الجسم (فلسطيني الجنسية)، بعد أن أقنعه واستدرجه إلى بيته لإبرام صفقة مالية، إذ قام بضربه بآلة حادة على مؤخرة رأسه، ثم قطعه بواسطة مقص

كهربائي دوار مُسنن إلى نصفين أعلى وأسفل، ليسهل حمله، ثم نقله إلى مكان يُدعى وادي الكوف على بُعد 15 كيلومتر تقريباً ودفنه هناك. وبعد أيام قليلة عثر أحد الرعاة على الجثة التي لم تُدفن جيداً. اعترف المجرم بارتكابه الجريمة، رغم أنه حاول التمويه بعد أن أخذ سيارة الضحية وأودعها في موقف للسيارات في مطار بنينه (مدينة بنغازي) للإيجاء بسفر المجني عليه. (نُفذ حكم الإعدام بالمجرم في عام 2007). وفي أحد الحوادث، قتل رجل زوجته، ثم نقلها ليلاً إلى جراج قريب، مزّق ملابسها بعنف مُعرياً جسدها لتبدو كما لو كانت اعتدي عليها جنسياً. أكّد التشريح وجود دلائل للخنق على غضاريف الحنجرة. اعترف الزوج بارتكابه الجريمة. وفي حادث آخر، اكتُشفت جثة على الطريق مُضَرّجة بالدماء بسبب طلقة في الرأس، وكأنها حدثت قبل ساعة. وقد تبين لاحقاً أن الجثة كانت محفوظة في المجمدة لمدة عامين!

فحص الجثة (The Autopsy):

إن كلمة (Autopsy) مُناظرة لكلمة Necropsy (فحص الجثة، أو تشريحها، أو فتح الجثة)، والتي تستعمل عادةً في الفحص بعد الوفاة، علماً بأن الكلمة الثانية قد تستعمل أحياناً لتعني الفحص الخارجي للجثة بعد الموت فقط.

هنالك نوعان من عمليات فحص الجثث، وهما:

1. فحص الجثة السريري (The clinical autopsy)، عندما يكون سبب الوفاة معروفاً في الغالب، إذ يُجرى الفحص لغرض التشخيص واكتشاف مدى الإصابات للأغراض الأكاديمية والتعليمية والبحثية.

2. فحص الجثة للأغراض الطبية الشرعية (The medico-legal autopsy)، ويتم هذا الفحص لاكتشاف بعض أو كل النقاط المُشار إليها أدناه:

أ. هوية الجسم.

ب. سبب الوفاة.

ج. طبيعة وعدد الإصابات.

د. وقت الوفاة.

- هـ. وجود سموم.
- و. توقع العمر لأغراض الضمان.
- ز. وجود أمراض طبيعية، ومدى مساهمتها في حدوث الموت، وخصوصاً إذا رافق ذلك التعرض إلى إصابة جسمية.
- ح. التنبؤ بطبيعة الإصابات، هل هي جنائية أو انتحارية أو ناتجة عن حادث.
- ط. التنبؤ عن أي ظروف أخرى غير طبيعية، تشمل تلك التي تترافق مع العمليات الطبية والجراحية.

الطب العدلي وعلم الأمراض (Forensic pathology):

لكي يتعرف أخصائي علم الأمراض (Pathologist) على أسباب وطريقة الوفاة وكيفية حدوثها، يجب عمل فحص شامل، فقد يكون تشريح الجثة غير كافٍ لمعرفة هذه الأسباب، ولكنه يجب الاستعانة بالتعرف على ظروف مسرح الجريمة، وكذلك بعض المعلومات عن تاريخ القتل.

أ. سبب وطريقة الوفاة وظروفها:

قد تحدث الوفاة نتيجة لإصابة أو لمرض كان سبباً في توالي الأحداث التي أدت في النهاية إلى الموت. وقد يكون سبب الوفاة إما قريباً (Proximate) أو في حينه (Immediate)، فمثلاً إذا سقط جدار على عامل بناء فأصابه بالشلل، وأدى ذلك الشلل إلى فقدان السيطرة على المثانة البولية، فتتج عن ذلك إصابات بكتيرية في المثانة، مما أدى إلى وفاة العامل، ففي هذه الحالة يكون السبب القريب للوفاة هو الإصابة التي جعلته مشلولاً، والسبب الحيني هو الإصابة البكتيرية للمثانة.

ولا تؤثر المدة الزمنية بين السبب القريب أو المباشر والسبب الحيني في سبب الوفاة، طالما أن الأحداث كانت مستمرة ومتابعة، فقد تكون تلك الفترة عبارة عن دقائق أو أيام أو سنين.

ويحدث الموت عن طريق (Mechanism) التغيرات البيوكيميائية والفسيولوجية غير الطبيعية التي أدت إلى الوفاة.

ومن الأمثلة على طرق الوفاة، هي الصدمة (Shock)، وكذلك التوقف القلبي الرئوي (Cardiac respiratory arrest). وتختلف طريقة الوفاة عموماً عن أسباب الوفاة، ويجب كتابة طريقة الوفاة وحدها في شهادة الوفاة. فمثلاً إذا أصاب طلق ناري دماغ شخص ما، وأدى ذلك إلى وجود انتفاخات وأورام في المخ أدت إلى الوفاة، فيكون هنا سبب الوفاة هو الطلق الناري، وهو الذي يُكتب في شهادة الوفاة، وليس طريقة الوفاة التي هي انتفاخات وأورام في المخ. أما ظروف (Manner) الوفاة، فهي الأحداث التي تُحيط بالوفاة. وعموماً تُقسم ظروف الموت إلى ما يأتي:

1. القتل.
2. الانتحار.
3. حادث.
4. طبيعي.
5. مجهول.

تحديد وقت الموت والتحليل

Time of Death, Decomposition and Identification

تحديد وقت الموت

تُعدّ عملية تحديد وقت الوفاة بعد اكتشاف الجثة بمدة ما، عملية صعبة، ولكن الأخصائي يحاول تحديد الوقت الدقيق الذي حدثت فيه الوفاة قدر الإمكان. وتكون العملية أكثر سهولة إذا كان هناك شهود لعملية القتل. وعموماً كلما زادت المدة بين وقت الموت ووقت اكتشاف الجثة، كلما كان تحديد الوقت الدقيق لعملية الموت أصعب.

وهناك بعض الملاحظات التي يجب مراعاتها لتحديد زمن الوفاة، ومنها: درجة حرارة الجسم، وتحلل أنسجة الجسم، ومحتويات المعدة. كما يجب أن نضع في الاعتبار قيمة الوسط والمناخ الذي توجد فيه الجثة، إذ إن لها الأثر الأكبر في تحديد موعد الموت.

وهناك العديد من عمليات الملاحظة التي من خلالها يتم التوصل إلى وقت الموت، ومنها:

1. ملاحظات ريجور مورتيس (التخشيب الموتي) (Rigor Mortis):

تُعرف ظاهرة التيبس أو التخشيب الموتي، بأنها حالة من التقلص التي تحدث في كل عضلات الجسم بعد الموت. تستبدل حالة الارتخاء الأول (Primary flaccidity) ناتجة عن فقدان الـ ATP اللازم لفصل الخويطات العضلية الأكتين (Actin) والميوسين (Myosin) خلال الارتخاء.

إن العضلات تبقى في حالة التخشيب حتى يحدث لبروتينات العضلات تحلل بكتيري، وهذا مهم من الناحية الطبية العدلية (Medicolegal) لتحديد وقت الوفاة، إذ يبدأ بعد ساعتين، ويصل إلى قمته بعد 18 ساعة، ويختفي بعد 24 ساعة.

تكون الجثة مرتخية تماماً بعد الموت مباشرة، وبعد ذلك بمرور 1 - 3 ساعات، تبدأ الجثة بالتصلب تدريجياً وتتجمد المفاصل.

وتظهر ملاحظات ريجور مورتيس أسرع كلما كانت درجة حرارة الجسم مرتفعة أكثر. الشخص المصاب بالحمى تظهر عليه هذه الملاحظات أسرع من الشخص الغير مصاب بها.

كذلك تظهر الأعراض أكثر سرعة إذا كان الشخص المتوفي يقوم بنشاط عضلي أكبر قبل الوفاة مباشرة.

كذلك تتم عمليات ريجور مورتيس بصورة أسرع في المناطق الحارة عنها في المناطق الباردة.

وتتصلب عضلات الجسم كلها في موعد واحد، ولكن بمعدلات مختلفة، وذلك حسب حجم العضلة، فمثلاً تتصلب عضلات الفك بسرعة أكبر من تصلب عضلات الركبة، ولذلك يجب على الطبيب العلي أن يلاحظ حركة كل من الفك والأذرع والأرجل.

ويُقال إن الجسم في حالة تيبس كاملة إذا كانت كل من عضلات الفك والكوع والركبة مُتيبسة (Complete Rigor). وتستغرق هذه العملية ما يقرب من 10 - 12 ساعة عند درجة حرارة 70 - 75 درجة فهرنهايت .

ويستمر الجسم في حالة تيبس لفترة ما يقرب من 24 - 38 ساعة، وذلك قبل أن تتفكك العضلات مرة أخرى بالترتيب نفسه الذي تيبست به.

ويجب ملاحظة أن الجسم يظل متيبساً حتى تفكيك أو يتم تحريك أحد مفاصله ميكانيكياً (عمداً)، ولذلك يمكن التعرف عما إذا كان تم تحريك ونقل الجثة بعد الموت أو ظلت مكانها.

2. ملاحظات ليفور مورتيس (Livor Mortis):

وتهتم هذه الملاحظات بالتغيرات في لون الجثة بعد الموت. وهي تعتمد على توقف ضخ الدم في الجسم بعد الوفاة، وتأثير الجاذبية الأرضية عليه، إذ يكون لون الجلد أحمر قرمزي (Purple red)، وتظهر ملاحظات ليفور مورتيس بعد ساعة واحدة من الوفاة، إذ تزداد قوة لون الدم تدريجياً حتى تثبت في مدة 8 ساعات. وإذا ضُغط على الجلد في هذه المرحلة، فإن لونه لا يختفي أو يتغير حتى إذا تغير موضع الجثة.

ويجب ملاحظة أن تحريك الجثة يتم التعرف عليه إذا تم العثور على كمية من الدم في مناطق كانت خالية منه بفعل الجاذبية أثناء الموت، وذلك من خلال لون الدم بها في الجلد. وملاحظات ليفور مورتيس تظل قائمة حتى يتحلل الجسم.

عند الوفاة إذا كان السبب التسمم بكل من أول أكسيد الكربون أو السيانيد، أو بسبب هبوط درجة الحرارة أو تجمد الجسم، يكون لون الجلد أحمر جداً (لون الكرز Bright cheery). أما لون الجلد عند الموت نتيجة فقدان الدم (نزيف)، فيكون فاتحاً أو ليس له لون، لعدم وجود الدم فيه.

ويجب ملاحظة أن من الصعب تطبيق ملاحظات ليفور مورتيس على الأفراد ذوي البشرة الداكنة.

3. ملاحظات الجور مورتيس (Algor Mortis):

وتسمى ملاحظات تبريد الجسم (Body cooling).

بعد الوفاة يفقد الجسم حرارته المعتادة ليأخذ درجة حرارة الوسط المتواجد فيه. وعموماً يُفقد النقص في درجات الحرارة في الساعات العشرة الأولى بعد الوفاة، ففي الظروف العادية تتراوح درجة الحرارة ما بين 70 - 75 درجة فهرنهايت، يفقد الجسم ما يعادل 15 درجة فهرنهايت كل ساعة.

ويجب ملاحظة أن استعمال درجة الحرارة في تحديد زمن الوفاة قد يكون فيها بعض الاستثناءات، وذلك لأن درجة حرارة الجسم 98.6 درجة فهرنهايت (37 درجة مئوية)، تختلف عن درجة حرارة الجو الطبيعي 70 - 75 درجة فهرنهايت (21 - 24 درجة مئوية). فمثلاً: (1) إذا كان المتوفي مات نتيجة إصابته بالحُمى أو نشاط عضلي كبير، فارتفعت درجة حرارته، فهنا لا يمكن تطبيق ملاحظات الجور مورتيس. (2) قد تكتسب الجثة درجة حرارة أكثر مما كانت عليه قبل الوفاة، وذلك إذا كانت درجة حرارة الجو عالية (فصل الصيف). ويجب أخذ درجة الحرارة مرتين مختلفتين، وذلك قبل تحريك الجثة. ويتم أخذ الحرارة من كل من الشرج والكبد، ويجب تسجيل درجة حرارة الجو أيضاً أثناء قياس درجة حرارة الجثة.

محتويات المعدة (Stomach contents):

يجب تحديد الوصف التفصيلي لمحتويات المعدة من طعام وسوائل من ناحية الحجم والنوع أثناء التشريح.

وتُفيد محتويات المعدة أولاً في تحديد نوع آخر طعام قام المتوفي بتناوله، وكذلك محتوياته. وثانياً تدل المحتويات على ميعاد آخر وجبة تناولها المتوفي.

فمثلاً إذا كان الطعام المتواجد هو طعام الإفطار، وتم اكتشاف الجثة في المساء، فيدل ذلك على أن الموت تم في الصباح.

به التحلل (Decomposition):

أولاً: يتحوّل الجلد إلى اللون الأخضر في منطقة البطن.

ثانياً: يبدأ انتشار هذا التحوّل في اللون إلى باقي أجزاء الجثة.

ثالثاً: تورّم الجثة نتيجة خروج غاز الميثان بواسطة البكتريا المتواجدة بصفة طبيعية في الجسم، وتنشط أكثر في الجو الحار. ويعتمد معدل وطبيعة تحلّل الجثة أساساً على المناخ المتواجدة فيه، فيختلف تحلّل الجثة التي تمّ دفنها في الأرض عن تلك التي أقيت في الماء أو تمّ تركها في الشمس أو في مكان بارد.

رابعاً: عندما تنتفخ الجثة تظهر تسلّخات جلدية، ويؤدي إلى تكسير صبغة الدم (الهيموجلوبين)، إلى أن تظهر الأوعية الدموية المحتوية على مواد التكسير من تحت الجلد بشكل مشابه للتعرّقات التي تظهر في الرخام، ولذلك تسمّى هذه العملية بالترّخم (Subcutaneous marbling).

خامساً: يتم تساقط الشعر من على الجثة.

سادساً: يؤدي الانتفاخ وارتفاع الضغط الداخلي للجثة بالغازات الناتجة عن البكتريا إلى خروج الدم وسوائل الجسم من فتحاته الخارجية.

سابعاً: يتم بعد ذلك تحوّل الجثة إلى هيكل عظمي تدريجياً بعد تآكل عضلاته. ويعتمد معدّل التحوّل على الظروف المناخية المحيطة بالجثة، فعند درجة حرارة 37.7 °م تتحوّل الجثة إلى هيكل عظمي خلال أسابيع قليلة. وعند درجة حرارة 18 °م قد لا تتحوّل الجثة إلى الهيكل إلّا بعد مرور شهور أو سنين. وبصفة عامة، فالجثة التي تُترك فوق الأرض بعد الموت لمدة أسبوع تكون ظاهرياً مُشابهة للجثة التي تُركت في الماء لمدة أسبوعين، أو تمّ وضعها في قبر لمدة ستة أسابيع.

ويجب ملاحظة أن الجثث المكشوفة تتحلّل بصورة أسرع من تلك المغطاة أو المُكفّنة.

وعند العثور على الجثة يجب وضعها في الثلاجة مباشرة، حتى يتم الانتهاء من إجراء التشريح والفحص وأخذ العينات المناسبة، إذ إن درجة حرارة الثلاجة توقف

عمليات التحلل نهائياً، وبعد الانتهاء من فحص الجثة ووضعها في درجة الحرارة العادية، يكون معدل تحللها أسرع مما كانت عليه قبل وضعها في الثلاجة. ويتم التحلل في المناطق المصابة والمجروحة بمعدل أسرع من المناطق السليمة، وذلك نتيجة حدوث النزيف وتواجد الدم ومُشتقاته.

بعد الكشف عن موقع الجريمة، تقوم الشرطة بتحديد المنطقة ووضع حاجز حولها لمنع غير المتخصصين من محو أو إضافة آثار جديدة، بقصد أو بغير قصد، أو نقل الدماء والدلائل البيولوجية من موقع إلى آخر بوساطة الأقدام. في حين يرتدي أعضاء الفريق المتخصص الأكياس البلاستيكية في أقدامهم. ويجب أن يراعى في ذلك بقاء كبار المسؤولين بعيداً في المراحل الأولية من التحقيق، كما يُمنع إجراء الحوارات واللقاءات مع الأجهزة الإعلامية. أما آراء الجمهور فيجب أن يتم التعامل معها بحذر، فقد يكون أحدهم هو الجاني، ويُعطي إجابات مُضللة لأعضاء الفريق.

مسرح وأداة الجريمة:

يتباين مسرح الجريمة، فقد يكون داخل المنزل أو خارجه، على سطح الماء أو اليابسة، وقد تكون الجثة عارية أو مغطاة، مدفونة جزئياً أو كلياً... الخ. وبشكل عام يكون المكان المُغلق أفضل من المكان المفتوح، لأن العوامل البيئية في الخلاء تكون أشد تأثيراً، فالرياح تأخذ معها بعض الآثار المهمة كالشعر، أو تطمس بعض الدلائل، كآثار الأقدام وبقع الدم التي تُغطى بالأتربة، فضلاً عن الفعل المدمر للحيوانات.

هذا وقد يوحى مسرح الجريمة وخصوصاً داخل المنزل إلى بعض ما دار في اللحظات الأخيرة من وقوع الجريمة. هل الأشياء في مكانها، أم تظهر عليها آثار بعثرة وفقدان؟ وهنا لا بُدَّ من توخي الحذر، فقد يعمد الجاني إلى التلاعب بمعالم مسرح الجريمة بما يخدم مصلحته في الخداع ومنع الوصول إليه.

في المراحل الأولية وقبل نقل الجثة إلى المشرحة، يهتم كل عضو من الفريق بتخصصه. فرجل الأمن يهتم بالباب الرئيسي، إذا كان مكسوراً أم سليماً، مغلقاً أم مفتوحاً، وكذلك بالنسبة للأبواب الأخرى والنوافذ، فضلاً عن أجهزة المنزل كالتلفزيون والراديو والحاسوب والهاتف والثلاجة، أي رسالة أو ورقة مكتوبة، فحص

المطبخ والحمام. يتم رفع البصمات من الأسطح الناعمة والملساء، وكذلك تصوير المكان بكاميرات عادية أو فيديو، فضلاً عن إعداد المخططات من قبل الرسامون، وهكذا.

في حين يتوجه فكر الطبيب إلى طبيعة الوفاة وسببها، فهل هي طبيعية أم حادث عرضي أم انتحار أم جريمة قتل؟ إذ يقوم بفحص الجثة وتحديد نوعية الإصابة، ثم يجمع كل الآثار والدلائل والعينات، كالدماء، القيء، المخاط، اللعاب، المنى، البول، البراز، الشعر، الألياف، قطع الملابس، الأتربة، الحُقن، المخدرات، آثار وأدوات أخرى. مُركّزاً خلال ذلك على ما يُسمّى بعلم الجريمة بـ(مبدأ التبادل)، والذي يعني أن الجاني قد يترك أثراً على الضحية أو حولها، وكذلك قد تترك الضحية أثراً على الجاني. وبعد أن يُكمل أعضاء الفريق إجراءاتهم الأولية، يُعطي الطبيب إرشاداته حول كيفية إخلاء الجثة إلى المشرحة.

والمحالات التالية تُبين أهمية الآثار البسيطة التي قد تُهمَل أو تُفقد، رغم أنها قادت إلى الجاني. فقد عُثر على شخص مقتول بسكين، بعدة طعنات نافذة في بطنه وصدره، ومُلقى على الشارع العام، وبعد فحص ملابسه والدماء المُضَرَّج بها، لوحظ اختلاطها بحبيبات زجاج ناعمة، قادت إلى ورشة لقص الزجاج كان المجني عليه يتردّد عليها في الأيام الأخيرة قبل قتله.

يمكن فحص الألياف الملتصقة بملابس أو جسم الشخص تحت الميكروسكوب، والتعرّف على نوعها ولونها وطبيعتها (صناعية، طبيعية، صوف، قطن، كتان، نايلون... الخ)، فهي تساعد في معرفة المكان الذي كان فيه. كما أن الشعر المتواجد في مسرح الجريمة، سواء كان بشرياً أم حيوانياً أو زغب أو ريش الطيور، يمكن أن يُفيد في هذا المجال. وعند فحص الشعرة تحت الميكروسكوب، يُلاحظ عليها الكثير من العلامات، مثل طول الشعرة ولونها، وكيفية التفافها وتعرّجها، وسمكها ومدى سلامتها... الخ. إذ إن التلف والتشققات والأضرار التي تحدث في محور الشعرة تعكس مدى النظافة والاهتمام الشخصي، ومن ثمّ فهل بالإمكان أن تعود لهذا الشخص أم لا؟

كما أن تأثيرات مكونات الشامبوات والمنظفات والصابون ومزينات وأصباغ الشعر، يمكن تتبعها بدقة. إن لاستعمال هذه المواد آثاراً مباشرة وغير مباشرة على الشعر لا بُدَّ من ملاحظتها بإمعان، إذ إن لهذه المواد آثاراً مباشرة تظهر بعد مدة قصيرة من الاستعمال، وغير مباشرة تُلاحظ بعد مدة أطول، ويمكن الاستدلال على كل ذلك سواء بالفحص العياني أو بالعدسات المكبّرة، أو المجاهر الاعتيادية أو الإلكترونية (وخصوصاً عند فحص بقايا تلك المواد على الشعر). ففي إحدى الجرائم اختفت طالبة نهاية اليوم الدراسي، وعُثر عليها مساء اليوم نفسه مقتولة خنقاً ومُلقاة في حديقة المدرسة. أظهر الفحص بالعدسات المكبّرة وجود شعيرات سجادة على ملابسها، وقد تبين لاحقاً أنها تعود إلى سجادة في بيت مدير المدرسة. كان المدير قد استدراج الطلبة إلى منزله واغتصبها ثم خنقها وألقاها في حديقة المدرسة. وفي جريمة أخرى، وُجدت فتاة مقتولة على الطريق، وأثناء فحص الطبيب لها تبين بأنها تعرّضت للاغتصاب، وقد عُثر على ورقة شجر يابسة في ملابسها. وبعد استدعاء أحد خبراء علم النبات من إحدى الجامعات، أشار إلى أن هذه الورقة تعود إلى أشجار غير موجودة في المنطقة نفسها، بل في متنزه يبعد 20 كم عن المنطقة. وقد تمّ التوصل إلى الجاني الذي يُقيم بالقرب من المتنزه، والذي قام باغتصاب الفتاة تحت إحدى هذه الأشجار. وفي حادثة مشابهة أرشد التراب الموجود على الجثة، لكونه لم يكن من تراب المنطقة نفسها، على مكان الجريمة الأصلي، بعد الاستعانة بأحد الخبراء الجيولوجيين. وفي مدينة البيضاء (ليبيا) عُثر على رجل قام بالانتحار بعد أن أطلق رصاصة على رأسه. وقد ترك قصاصة ورق سجائر صغيرة في جيب معطفه، كتب عليها اعترافه بالإقدام على قتل نفسه، تؤكد قيامه بالانتحار، فضلاً عن الأدلة الأخرى.

وعن المنظر العام للموقف وما قد يوحى إليه، نذكر الحوادث الآتية:

رجل في الخمسين من عمره ويعيش بمفرده، لم يُشاهد منذ أسبوعين. حين دخل فريق البحث الجنائي إلى منزله وجدوا أدواته مبعثرة وجسده شبه عارٍ وعليه آثار سحقات وكدمات، وهذا ما يُشير إلى وقوع عنف، إلا أن التشريح بين موته من جراء مرض التهاب السحايا الذي يؤدي إلى قيام المريض نفسه بالعنف في المراحل الأخيرة

من هذا المرض. وفي حادثة قتل عُثر على جثة جرفها الموج إلى شاطئ البحر، وبها جروح قطعية على الفخذ والذراع، وكدمات على الوجه والرقبة. أثبت التشريح أن القتل سقط في الماء حياً ومات غرقاً، وتبين أنه تشاجر مع شخص آخر على الشاطئ دفع به إلى الماء أثناء المشاجرة.

هذا ولا بُدَّ من ملاحظة أثر المهنة على الجسد أو الملابس، فهي تُفيد في التعرف والاستدلال، فالحداد وميكانيكي السيارات يمكن الاستدلال عليهما مثلاً من خلال آثار المهنة على أصابع وراحة اليد، والجزار يمكن الاستدلال عليه من رائحة اللحم والدم في ملابس العمل، وهكذا بالنسبة لبقية المهن الأخرى.

التعرف على بقايا:

إن الخطوة الأولى هنا، هي إثبات ما إذا كانت تلك البقايا آدمية أم حيوانية. بعد الانتهاء من هذه المرحلة، لا بُدَّ من التعرف على الجنس، ذكر أم أنثى، وذلك من خلال عظام الحوض والجمجمة التي تتميز بوجود علامات فارقة كثيرة بين الجنسين. ثم بعد ذلك يتم التوجه إلى قياس أطوال العظام، وما إذا كانت تظهر عليها آثار كسور وأسلحة.

وقد أمكن في السنوات الأخيرة باستعمال الكمبيوتر، من رسم صورة تقريبية للشخص على حجمته، ولكن ينقصها الدقة وعاجزة عن إظهار الواقع الحيوي بتفاصيله السابقة.

أهمية الدماء:

من الدلائل المهمة التي على الطبيب الالتفات إليها، هي الدماء، فهل هذا اللون الذي أمامه دم أم لا؟ وهل هي دماء آدمية أم حيوانية؟ إلى أن يصل إلى مرحلة تحديد المجموعة، وإذا كانت العينة الدموية غير صالحة لفحص مجموعة الدم، فهنا لا بُدَّ من العودة إلى إجراء البصمة الجينية بالاعتماد على الـ DNA المستخلص من تلك العينة الدموية. هذا وقد تساعد إفرازات الجسم كالألعاب والعرق وعصارة المعدة في التعرف على مجموعة الدم في 80% من البشر.

كما أن سيل الدم على الجثة له دلالة أيضاً، فإذا كان طويلاً، فهذا يعني أنه سال في وضع الوقوف، وإن كان دائرياً حول الجسم، فذلك يعني أنه سال في وضع الاستلقاء.

التزف:

وهو فقدان كمية من الدم (أكثر من 40٪)، يؤدي إلى غياب الوعي والوفاة. فبعض المصابين يفقد وعيه بسرعة، وبعضهم يتحرك، وربما يجري لمسافات طويلة قبل سقوطه. وغالباً ما يتوقف التزف بعد الوفاة، لكنه قد يستمر لفترة وجيزة من بعض الأماكن، مثل فروة الرأس.

السلاح وموقع الجريمة:

يكون السلاح موجوداً في الموقع عند حالات الخطأ والانتحار، (إلا إذا قام شخص ما بإخفائه)، وهنا لا نعثر على آثار تخريب، كما يمكن أن يموت المنتحر وهو قابض على سلاحه، وإذا حدث أن أدت قوة رد الفعل إلى دفع السلاح، فإنه يبقى في المكان. أما في القتل العمد، فيندر وجود السلاح، ويكون الإطلاق من مسافات أبعد وعلى أماكن غير تلك المفضلة بالانتحار (كالصدغ والفم). فمن المستحيل أن يُطلق المنتحر النار على نفسه من الخلف. ولكن بعض المتفنيين قد يقوم بربط زناد المسدس بعد تثبيته بحبل على مسافة معينة لا تدلّ على أنه هو الفاعل، ثم يطلق النار على نفسه، أو يتفق مع شخص آخر لإطلاق النار عليه، أو يُطلق النار هو بنفسه على منطقة غير قاتلة في جسمه، كأن يسحب الجلد بيده من خاصرته بعيداً ثم يطلق النار (أو يطلق على أصابع القدم)، كما حصل وفعل بعض الجنود في الحرب العراقية - الإيرانية للتهرب من ساحة الحرب المشتعلة (وبعض الشر أهون).

قال لي أحد الجنود بأنه قام وبالاتفاق مع زميله على أن يُطلق رصاصة على قدمه اليسرى بعد أن يضع أمام فوهة المسدس قارورة الماء (الزمزية التي يستعملها الجنود لشرب الماء) للتقليل من حرارة الرصاصة وضربها حسب اعتقاده... ذكر لي ذلك بعد أن سألته عن سبب التشوه الموجود على مشط قدمه.

الدم وموقع الجريمة:

في البداية لا بُد من معرفة هل تلك الدماء حقيقية أم أصباغ، وهل هي دماء إنسان أم حيوان، وتوجد اختبارات معينة لحل هذه المشاكل. كما أن شكل قطرات الدم وتوزيعها في مسرح الجريمة له دور مهم في تفسير ما حدث عند تنفيذ الجريمة. فالشريان مثلاً يقذف الدم إلى مسافات بعيدة على الجدران والمكان، وينتشر الدم أثناء حركات الطعن المتكررة. أما الدم النازف من الوريد فيتجمع على شكل بقعة. والنقاط الساقطة في مسار خطي تدل على تحرك جسم نازف. القطرة التي تسقط بوضع عمودي تكون مستديرة ذات حافة مُستتة، والتي تسقط بزاوية أثناء الحركة تكون كمثرية أو على شكل علامة التعجب، مُشيرة إلى اتجاه الحركة. طبع آثار الدم يعني أن شخص مشى في الموقع، وهذه الطبعات قد تعود للضحية أو للجاني، كما أن شكل طبعات الأقدام سواء كانت عارية أو بحذاء يجب أن يؤخذ بنظر الاعتبار للأهمية. فالأقدام العارية يمكن أن ترسم بصمة أصابع القدم، وتطبعها على شكل بقعة دم على الأسطح الناعمة كالسرايميك مثلاً، وشكل التخطيطات على قاعدة الحذاء يمكن أن تساعد هنا أيضاً، وهكذا.

تحديد زمن الوفاة من الموقع:

من المهم هنا الاستفادة من الموقع في تحديد هذا الزمن، فالعثور على الجثة داخل المنزل يُسهّل المهمة، إذ أصبح من المعتاد أن يموت شخص يعيش بمفرده في منزله ولا ينكشف أمره إلا بعد انبعاث الرائحة الكريهة وزيادة حركة الحيوانات حول بيته. وقد نستطيع الاقتراب أكثر من تحديد هذا الزمن من خلال تواريخ الصحف الموجودة على طاولته، كما أن فحص بقايا الأكل على المنضدة والمطبخ يمكن أن يساعد أيضاً. فضلاً عن ذلك فإن آخر المكالمات الصادرة الموجودة في نقال الضحية يمكن أن يخدم نفس الغرض.

وفي العراء فإن برودة الجسم والتغيرات التي تحدث بعد الوفاة ترتبط بالظروف البيئية، كدرجة حرارة الجو ونسبة الرطوبة وسرعة الرياح، كما أن يرقات الحشرات

ومرات انسلاخها، وخصوصاً ذباب الجثث الذي يضع بيوضه داخل الجثة للفقس والنمو.

هنالك ما يزيد على 10 أنواع من الذباب، وبعض أنواع الخنافس والنمل تبيض وتتغذى يرقاتها على الجثث، ومنها ما يضع أعداداً كبيرة من البيض، إذ إن أحد أنواع الذباب يضع 300 بيضة في المرة الواحدة، ويكرر ذلك 10 مرات في حياته. إذ تحتاج إناث تلك الحشرات إلى وجبة بروتينية لتكوين البيض، فتبحث عن جثث أو براز. وبعض الذباب يضع بيضاً مُحَصَّباً داخل الجثة، والبعض الآخر يضع اليرقات مباشرة في الجثة (مثل ذبابة اللحم). ومن هذا الذباب ما يتميز بألوان زرقاء أو خضراء براقّة. يحوم الذباب حول الجثة بعد دقائق من إلقائها، ويبدأ بوضع البيض خلال ساعة في فتحات الجسم الطبيعية والجروح.

كما أن نمو الفطريات على الجثة، وعلاقته بالفترة الزمنية لدورة الحياة يمكن أن يُعطي دلائل مهمة لمساعدة الخبير البيولوجي في تحديد زمن الوفاة.

وفي أحيان أخرى، وخصوصاً بعد فترات طويلة نسبياً، تنمو نباتات عشبية أو شجرية بين أجزاء الجثة، بحيث يمكن تحديد عمر هذه النباتات من خلال المقاطع العرضية في سيقانها أو جذورها، ولكن المشكلة في العراء تكون أكثر تعقيداً، لأن بعض الحيوانات تلتهم الجثة وتطمس الكثير من الأدلة، مع العلم بأن تلك الحيوانات قد تقدّم خدمة لفرق البحث، فكثرة حركتها ونبشها في التراب غالباً ما يُشير إلى جثة مدفونة.

أما في الماء، فإن طفو الجثة بعد فترة من سقوطها في الماء لا يعني الكثير بالنسبة لتحديد زمن الوفاة، فهو مرتبط بنسبة الدهون في الجسم، وسرعة تكوّن الغازات داخل الجثة، إذ لوحظ بأن جثث النساء والجثث السمينة تطفو أسرع من غيرها. وقد تقوم الأسماك والحيوانات المائية بالتهام الجثة وطمس الكثير من معالمها. وللتنويه فقط، فإن الماء المالح (ماء البحار والبحيرات المالحة) يُشكل مادة حافظة للجثة بفعل وجود الملح، ممّا يُطيل من الفترة اللازمة لتفسخ الجثة، مقارنةً بالمياه العذبة، كما أن الجثث تكون أسرع طفواً في المياه المالحة مقارنةً بالمياه الحلوة، وذلك بفعل الكثافة العالية للماء المالح.

مواقع الحريق:

بحدود 70٪ من وفيات الحرائق تحدث في المنازل، وأكثرها يبدأ في المطبخ، خصوصاً من جراء تسرب الغاز بسبب المفاتيح والأنابيب المعطوبة أو الغير محكمة الغلق، وعندما ينشغل الشخص المحروق بنفسه، يهرب ويترك مفتاح الغاز مفتوحاً، مما يزيد الطين بلة. كما أن نسبة لا بأس بها من حرائق البيوت يكون سببها الأطفال والإهمال من جراء ترك عيدان الثقاب والقداحات النارية في متناولهم، وبنسبة 10٪ من الحرائق تكون متعمدة أو للمكيدة أو محاولات انتحار. وتساهم الطاقة الكهربائية وبالذات ثمّاسات الأسلاك الكهربائية أيضاً في هذه الحوادث. ففي أحد الحوادث كان قُرب المصباح الكهربائي من قطع القماش التي نضدت فوق دولاب الملابس سبباً في اندلاع حريق ضخّم التهم معظم الدار تقريباً.

وإذا امتد الحريق وباغت عدداً كبيراً من سكان بناية ما، عندئذ تتنوّع الإصابات لتشمل إضافة للحروق المباشرة، الاختناق بالغازات الساخنة والسامة وضحايا انهيار البناية أو أجزاء منها. هذا وتساهم أشعة الشمس بشكل أو بآخر في حدوث بعض الحرائق، إذ تصل درجة الحرارة في العراق وتحت أشعة الشمس الملتهبة إلى رفع درجة الحرارة لأكثر من 50 °م مُسببة انفجار غالونات البنزين، ولربّ قطعة زجاج معيّنة مرمية على عشب جاف أدّت ولأكثر من مرة إلى تركيز الأشعة وإحراق العشب وما حوله.

الانفجارات الضخمة:

في المناطق الصناعية والمزدحمة، تؤدي الانفجارات الضخمة في خزانات الغاز والوقود، أو نتيجة الأعمال الإرهابية إلى حدوث خسائر كبيرة في الأرواح والأموال، إذ ينتج عنها تأثير مزدوج، يتمثل الأول عن الضغط الهائل والخلخلة والعصف، والتي في الغالب تؤدي إلى تناثر الأجسام وانهيار وتصدّع المباني، والثاني انتشار الحريق والأجزاء المتفجرة المشتعلة في كل اتجاه. تُقذف الأشياء انطلاقاً من مركز الانفجار إلى مسافات أبعد، بحيث يمكن الوصول إلى هذا المركز من خلال ملاحظة اتجاه الجدران الساقطة والأبواب والشبابيك والأجسام المتطايرة (الشكلان 11 - 1، 11 - 2).



شكل (11 - 1). أدت قوة الانفجار
إلى تمزق جسد الضحية بهذه الصورة،
وتبعثر الأضلاع بعيداً عن الجزء
الرئيسي من الجسد



شكل (11 - 2). أحد ضحايا المتفجرات، تبيّن اجتماع ثلاثة أنواع من الجروح المميّزة
لهذا النوع من الإصابات، وهي الكدمات والسحجات والتهتكات الصغيرة

مواقع التسمم بالغاز:

يحدث أن يتسمم الناس القريبين من مكائن الاحتراق الداخلي أو مدافئ أو طبابخ النفط والغاز وعوادم السيارات، وخصوصاً داخل الأماكن القليلة التهوية كالجراجات والمطابخ المغلقة. فمثلاً ينطبق على ذلك غرف النوم التي تُترك فيها مدفآت نفطية مشتعلة حتى الصباح في العراق أو في مصر من جرّاء تسرب الغاز من صنبور غاز مفتوح دون اشتعال.

يُعدّ غاز أول أكسيد الكربون من أشهر الغازات المُسببة للموت، وذلك لألفته العالية للاتحاد مع الهيموجلوبين، مقارنةً بالأوكسجين، كما أن غازي الميثان وثاني أكسيد الكربون تُعدّ أيضاً من الغازات الخطرة، والتي تزداد نسبتها في الأماكن

العميقة مثل شبكات الصرف الصحي والآبار والمناجم، وفي هذه المناطق تنخفض نسبة الأوكسجين تدريجياً مع العمق لتصل إلى 2٪ بدلاً من 20٪ لتحل محلها الغازات سائلة الذكر. وهناك أمثلة كثيرة على أشخاص نزلوا إلى قاع خزان صرف صحي أو بئر، فلم يخرجوا منه. فقد حدث في إحدى المرات أن توفي ثلاثة عمال مجاري في حي نادر في الحلة (بابل)، عندما حاول العاملان الثاني والثالث إنقاذ من سبقه من القاع. وقد يحدث أحياناً أن تؤدي هبة الغاز المنضغطة المندفعة بسرعة باتجاه فتحة غطاء البالوعة للأعلى خنق الشخص الذي رفع الغطاء، وخصوصاً إذا كان ذلك الغطاء المعدني لا يحتوي على ثقب تنفيس، لذلك من الضروري تجهيز شبكات المجاري الصحية في البيوت والمنشآت بأنبوب عمودي مفتوح باتجاه الأعلى. وأذكر وفاة أحد أقاربي (رحمه الله) في حي الكرامة (الحلة) عندما سكب السائل الذي يوضع في بطاريات السيارات (حامض قوي) في مجرى الحمام لغرض فتحه، وحينها انطلقت هبة غازية قوية في وجهه وخنقته، إلى درجة أنك ترى ازرقاق جسمه من حزام البطن فاعلى.

التسمم بالمبيدات والمعادن الثقيلة:

يحدث التسمم في أحيان كثيرة بالمبيدات، وخصوصاً للأشخاص العاملين في هذا المجال والمتضررين بقصد أو بغير قصد، وتشكل المبيدات الحشرية الفسفورية العضوية وسموم القوارض، مثل فوسفيد الزنك والبروديفاكوم المستعملة في المنازل والحدائق خطراً كبيراً في هذا المجال. وأذكر بعض الحوادث لتقريب الصورة، فمثلاً قامت امرأة بوضع القشطة في طبق فيه بقايا لسم فئران وتقديمه إلى أطفالها الثلاثة كوجبة إفطار شهية انتهت بموت الثلاثة. وفي ذات مرة قامت إحدى الأمهات بوضع مييد الكلوريدين المشابه للون البيسي كولا في عبوة شراب بيبي كولا فارغة، عندها قام الطفل المتخلف عقلياً بشربه، وهنا ثار جدل كبير حول تعمد الأم في وضع المييد في قنينة المشروب، أم أنه حدث سهواً، والله أعلم! وفي مدينة الحلة قامت إحدى الأمهات الذكيات، بعد أن لاحظت القمل يُعشش في شعر رأس أطفالها الأربعة، بوضع كمية كبيرة من المبيد الحشري بف باف مساء وتركه حتى الصباح، ولولا رحمة ربك وتدخل الأطباء وعلاجهم بحقن الأتروبين، لانتهى الأمر بكارثة... وكلنا يتذكر كارثة القمح

المعقر بالزئبق التي حدثت في السبعينيات في العراق، والذي جهّز لأغراض الزراعة، ولكن البعض استعمله لأغراض الأكل، الأمر الذي أدى إلى حدوث وفيات كثيرة، فضلاً عن أعداد كبيرة من المعاقين، إذ يؤدي الزئبق إلى أضرار غير راجعة في الجهاز العصبي المركزي، بحيث يعاني المصاب من اختلال واضح أثناء الكلام والمشى والحركات الأخرى.

السقوط من ارتفاع:

يتعرّض العديد من الأشخاص إلى السقوط من ارتفاعات عالية بدافع الانتحار، أو لأسباب غير مقصودة، أو هرباً من حريق حاصرهم، مما اضطرهم للإلقاء أنفسهم من علو. كما حصل وأن رمى عدد من الأشخاص بأنفسهم من ارتفاعات قاتلة فراراً من النار المتوهجة في برج التجارة العالمين في 11 سبتمبر 2001، بعد أن تمّ تفجيرهما بواسطة طائرات نقل الركاب في منهاتن، أمريكا. ويكون الأطفال ومرضى الصرع أكثر من غيرهم عرضةً لتلك المخاطر، فكم من طفل كان العوق أو الموت نصيبه بسبب حمامة واقفة على أعلى المنزل. وكذلك العمال وخصوصاً أولئك الذين يعملون على تنفيذ وترميم البنايات العالية وفي عمل قوالب الخشب والخرسانات للعمارات. وفي أحيان أخرى يحدث السقوط من علو شاهق نتيجة اختلال التوازن أو انزلاق الأقدام أو عيب في البناية، ولا يغيب عن البال احتمال اصطدام الجسم لأكثر من مرة أثناء سقوطه باتجاه الأرض. هذا ويمكن أن يؤدي الشجار بين الأشخاص إلى أن يدفع أحد المتشاجرين خصمه باتجاه الشرفة أو النافذة ومنها إلى أسفل. ويعمل بعض المجرمين على إلقاء ضحيته قبل أو بعد قتلها مباشرةً من أعلى، بهدف التمويه، وأحياناً بعد أن يُرغم الضحية على كتابة اعتراف خطي بالانتحار. ولعلنا نتذكّر التشكيك والجدل الحاد الذي احتدم في وسائل الإعلام حول كيفية سقوط الفنانة سعاد حسني من شرفة شقة صديقتها ووفاتها في لندن عام 2002.

حوادث الغرق:

تحصّد حوادث الغرق عدداً لا بأس به من الأرواح، وهي الأخرى قد تكون بقصد أو بغير قصد. فأغلب الغرقى الطبيعيين إما أن يموتوا بسبب جهلهم بقواعد

ومهارات السباحة أو بسبب وجود تيارات وأمواج المياه القوية المتولدة في العمق. ولعل ما يُطلق عليه بدوّارات المياه (السوارات) في عمق الماء، والتي تعمل على سحب الشخص باتجاه مركز الدوّارة القوي، ومن ثمّ إلقائه في العمق، أحد تلك الأسباب، وقد لا ينجو منها حتى السباح الماهر. فضلاً عن ذلك، ما يحدث من تشنّج أو إجهاد في عضلات السباح، وخصوصاً عضلات الأرجل. يزداد ارتباك الشخص بعد أن يأخذه الماء باتجاه العمق، ممّا يُشكّل ضغطاً نفسياً أكثر خطورة عليه، ينعكس في حركات مُجهدّة مرتبكة. ويظهر هذا الأمر جلياً على الأشخاص المتحرّين الذين لا يعرفون السباحة بعد أن يتندّموا في آخر لحظات الفرق. وهذا ما حدث بالفعل لأحد طلاب المدارس، والذي انتحر في مدينة الصويرة في العراق بعد أن هدّده أباه القاسي بعقاب صارم إذا رسب في المدرسة، إذ لوحظت آثار أصابع التشبّث بحافة الجرف الطينية الحادة للشطّ المندفع بقوة في محاولات يائسة لإنقاذ نفسه.

حوادث الطرق:

هنالك نوعين من حوادث الطرق، يشمل النوع الأول الحوادث التي تواجه الأشخاص من خلال صدمة يتعرّض لها المارّون أو الواقفون في الطرق والساحات. أما النوع الثاني فيتمثّل بالحوادث التي يتعرّضون لها وهم في داخل السيارة. ففي النوع الأول يتعرّض المصاب إلى صدمة مباشرة من السيارة في مستوى الحوض والركبتين، ثمّ يتحدّد مسار الأمور تبعاً لسرعة السيارة، فعند السرعة البطيئة (أقل من 60 كم / ساعة) يُطرح العابر أرضاً، ويواجه كل عواقب الارتطام بالأرض من سحبات وكدمات إلى كسور بسيطة ومركّبة (أخطرها كسر في قاع الجمجمة)، ثمّ احتمال السحق بسيارة أخرى. أما عند السّرع العالية، فقد يطير الشخص في الهواء ليسقط على مقدمة السيارة مُهتّماً الزجاجة الأمامية. وقد ينتهي به الأمر إلى دخول السيارة (تُسمّى عملية غرف)، وغالباً ما يصطدم رأسه بجزء من المقدمة قبل دخوله.

أما ما يحدث داخل السيارة بعد اصطدامها من الأمام، فيشكّل مجموعة من الأحداث المُتسارعة والمتلاحقة، ففي البداية يندفع الركاب، كردّ فعل، بقوة إلى الأمام، كلّ بما يواجهه، السائق مع المقود، والركاب مع ما يقابلهم من المقاعد، بحيث

يتعرضون لكسور في الأطراف وتمزق في الأوعية الدموية الكبرى في العنق والصدر، بسبب حركة الرأس التي تحدث بشدة إلى الأمام ثم إلى الخلف.

هذا وتشير الإحصائيات إلى أن الراكب المجاور للسائق هو أكثر الركاب عرضة للهلاك، وحتى أكثر من السائق نفسه، لأنه يُفاجأ بالموقف، بينما يكون السائق أكثر حيطة وحذراً، كما أن السائق يهرب لا إرادياً كردة فعل انعكاسي باتجاه أبعد من هدف الاصطدام على حساب من يجلس بجانبه، فيكون الشخص المجاور للسائق هو الضحية، وهذا ما حصل بالفعل عندما هرب أحد السائقين من الاصطدام بقرة في الطريق الزراعي، وانتهى ذلك باصطدام السارة من جهة الشخص المجاور، بشجرة ضخمة حاول السائق أن يتحاشاها أيضاً، ومات الشخص قبل وصوله للمستشفى. وقد يحدث بأن يُلقي السائق بنفسه خارجاً بعد أن يفتح الباب تاركاً السيارة تتدحرج إلى قدرها المحتوم، كما فعلت إحدى الأمهات عندما هربت وتركت أطفالها الثلاثة في السيارة التي اندفعت إلى هاوية النهر.

وقد تلعب طبيعة القوانين دوراً في زيادة معدل الوفيات، ففي العراق وبلدان أخرى مثلاً يتحاشى بعض الناس حمل أو إنقاذ شخص مدهوس بسيارة ومُلقى على قارعة الطريق، لأنه قد يتم إيداع الشخص المبلغ أو المُنقذ في السجن إلى حين استكشاف الحقيقة، ويزداد الأمر سوءاً إذا مات المصاب قبل وصوله المستشفى. وفي حوادث أخرى يقوم صاحب السيارة بترك الضحية مضرجة بدمائها ويهرب مخافة من العواقب، ولعل أقبح ما في الأمر هنا قيام بعض السائقين بالإجهاز على الضحية بعد أن يدوس عليه مرةً أخرى، طالما أن بقاء المصاب في المستشفى يعني بقاء السائق في السجن، أو أن المصاب قد تعرّف على شخصية السائق الذي دهسه بقصد أو بغير قصد.

ولا يفوتنا هنا بأن نتذكر حوادث احتراق السيارات بعد انفجار خزّان البنزين، أو بعد تصادم سيارتين مع بعضهما البعض، إذ يحدث تفريغ كهربائي بين المركبات المتصادمة بفعل فرق الجهد الكهربائي المتولد في البدن المعدني للسيارات، مولداً شرارة كهربائية حارقة، لذلك يفضل وضع سلسلة معدنية متدلية من السيارة بحيث تمس

الأرض لتفرغ هذه الشحنات، وهذا ما يحدث بالفعل في ناقلات الوقود الصهرجية للبنزين والنفط.

حوادث القطارات:

تتنوع حوادث القطارات، فقد يخرج عن مساره وينقلب على الأرض أو في الماء، أثناء عبوره أحد الجسور، أو ينحرف عن خط سيره فيدخل في منطقة مأهولة، أو تنزل مقدمته في ترعة، كما فعلها قطار المناشي. وقد سخرت الصحف من صورته وكتبت تحتها نزل ليشرب. وقد يتصادم قطار مع آخر من الأمام أو الخلف، وخصوصاً عند نقاط التقاطع لخطاً في السيطرة على خطوط السكك، أو يتصادم مع سيارة أخرى، وهذا ما حدث بالفعل عندما شطر قطار حافلة نقل ركاب كبيرة متوجهة من الحلة إلى بغداد، إلى نصفين. وفي كل الأحوال تتشابه الإصابات في داخله مع ما يحدث داخل أي سيارة، إلا أن نظام المقاعد المتقابلة في القار يُعطي فرصة أكبر لارتطام الركاب ببعضهم.

هذا وقد يُقدم شخص على الانتحار بالاستلقاء على السكة، لتُقسمه العجلات عند المكان الذي اختاره لنفسه. وكثيراً ما تحدث الإصابات والوفيات عند محاولة بعض الأشخاص الركوب أو النزول قفزاً من بوابات القطار أثناء مروره في القرى والأحياء وتخفيف سرعته (شكل 11 - 3).



شكل (11 - 3). بتر في الساقين عند مفصل الركبة بفعل عجلات القطار
وأخيراً، في القطارات التي تعمل بالكهرباء، تُضاف خطورة الصعق بتيار
كهربائي يصل فرق جهده إلى 600 فولت.

References المصادر

- Amos, B. and Pemberton, J. (1993). DNA fingerprinting in non-human population. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2: 857-860.
- Ayala, F.J. and Black, B. (1993). Science and the courts. *Am. Sci.* 18: 230-239.
- Belay, E.D. (1999). Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu. Rev. Microbial.* 53: 283-314.
- Britten, R.J. and Kohne, D.E. (1970). Repeated segments of DNA. *Sci. Amer.*, 222 (4): 24-31.
- Burden, D.W. and Whitney, D.B. (1995). *Biotechnology: Proteins to PCR*. Birkhause, Boston, USA.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio. Technol.*, 9: 553-557.
- Cummins, H. and Midlo, C. (1976). *Fingerprints, palms and soles. An introduction to dermatoglyphics*. Mass Research Publishing, New Berlin.
- Curtis, H. and Barnes, N.S. (1989). *Biology*. 5th ed. Worth Publishers, INC. NY.
- Darnell, J., Harvey, L. and David, B. (1986). *Molecular cell biology*. Scientific American Books. NY.
- Dib, C., Faure, S., Fizmanes, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A. and Millasseau, P. (1996). A comprehensive genetic map of human genome based on 5, 264 microsatellites. *Nature*, 380: 152-154.
- Epplen, J.T., McCarrey, J.R., Sutou, S. and Ohuo, S. (1982). Base sequence of cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male specific putative mRNA in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79: 3798-3802.
- Gardner, E.J. and Snustad, D.P. (1981). *Principles of genetics*. 6th ed. John Wiley & Sons, NY.
- Gill, P., Ivanov, P.L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg, E. and Sullivan, K. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis, *Nature Genetics*, 6: 130-135.
- Guyer, M.S. and Collins, F.S. (1995). How is the human genome project doing and what have we learned so far? *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 92: 10841-10848.
- Hammond, H.A., Redman, J.B. and Caskey, C.T. (1995). In uteropaternal testing following alleged sexual assault. *JAMA.*, 273: 1774-1777.
- Hoelzel, A.R. and Amoss, W. (1988). DNA fingerprinting and scientific whaling. *Nature*, 333: 305.
- Holt, S.B. (1968). *The genetics of dermal ridges*. Charles C. Thomas Publisher,

USA.

- Housman, D. (1995). Human DNA polymorphism. *N. Eng. J. Med.*, 332: 318-320.
- Jeffreys, A.J., Brookfield, J.F. and Semwonoff, R. (1985). Positive identification of an immigration test case using human DNA fingerprints. *Nature*, 317: 818-819.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L. (1985). Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-73.
- Jones, K.W. and Singh, L. (1982). Conserved sex-associated repeated DNA sequences in vertebrates. In: *Genome evolution*. (Eds. Dove, G.A. and Flavell, R.B.). Academic Press. NY. PP. 135-154.
- Jorde, L. B., Carey, J.C., Bamshad, M.J. and White, R.L. (1999). *Medical genetic*. 2nd ed. Mosby, Inc. USA.
- Joshi, C.P. and Nguyen, H.T. (1993). Application of random amplified polymorphic DNA technique for detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheat. *Genome*, 36: 602-609.
- Klug, W.S. and Cummings, M.R. (1999). *Essential of genetics*. 3rd ed. Prentice Hall. USA.
- Klug, W.S. and Cummings, M.R. (2003). *Concepts of genetics*. 7th ed. Prentice Hall, USA.
- Knight, B. (1997). *Simpson's forensic medicine*. 11th ed., Arnold Group. London.
- Koshland, D.E. (1994). The DNA fingerprint story. *Science*, 275: 1015.
- Krawczak, M. and Schmadtke, J. (1994). *DNA fingerprinting*. Oxford: BIOS Scientific.
- Krontiris, T.G. (1995). Minisatellites and human disease. *Science*, 269: 1682-1683.
- Lewin, B. (1983). *Genes*. John Wiley & Sons, NY.
- Lewontin, R. and Hartl, D. (1991). Population genetics in forensic DNA typing. *Science*, 254: 1745-1750.
- Llody, M.A. and Fields, M.J. (1989). Bkm minisatellite sequences are not sex associated but reveal DNA fingerprint polymorphisms in rainbow trout. *Genome*, 32: 865-868.
- Mader, S.S. (2002). *Human biology*, 7th ed. McGraw-Hill. NY.
- Marx, L. (1988). DNA fingerprinting takes the witness stand. *Science*, 240: 1616-1618.
- McEwen, J.E. and Reilly, P.R. (1994). A review of state legislation on DNA forensic databanking. *American Journal of Human Genetics*, 54: 941-958.
- Mullis, K.B., Ferre, F. and Gibbs, R.A. (1994). *PCR-the polymerase chain reaction*. Birkhauser Verlag, AG.

- Norris, R. (1994). Forensic DNA goes to court with O.J. Science, 265: 1352-1354.
- Old, R.W. and Primrose, S.B. (1985). Principles of gene manipulation: An introduction to genetic engineering. Blackwell Scientific Publication.
- Pai, C.Y., Chou, S.L., Yang, C.H. and Tang, T.K. (1995). Flow chart HLA-DQA1 genotyping and its application to a forensic case. Journal of Forensic Sciences, 40: 228-235.
- Rychlik, W., Spencer, W.J. and Rhoads, R.E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. Nucleic Acids Research, 18: 6409-6412.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J. Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. The first description of PCR with Taq polymerase. Science, 239: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Shimada, T., Hayama, H., Haji, T., Yamaguchi, M. and Yoshida, M. (1999). Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Euphytica, 109: 143-147.
- Singh, L., Purdom, I.F. and Jones, K.W. (1980). Sex chromosome associated satellite DNA: Evolution and conservation. Chromosome, 79: 137-157.
- Snustad, D.P., Simmons, M.J. and Jenkins, J.B. (1997). Principles of genetics. John Wiley & Sons, INC. NY.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98: 503-517.
- Stryer, L. (1988). Biochemistry. 3rd ed. W.H. Freeman and Company. NY.
- VanOarschot, R.A.H., Gutowski, S.J. and Robinson, S.L. (1994). HuMTHO1: amplification, species specificity, population genetics and forensic applications. International Journal of Legal-Medicine, 107: 121-126.
- Watson, J.D., John, T. and David, T.K. (1983). Recombinant DNA: A short course. W.H. Freeman and Company. NY.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primes. Nucl. Acids Res., 18: 7213-7218.
- Willams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res., 18: 6531-6535.

- بن عمران، فوزي عبد السلام. (2004). أساسيات الطب الشرعي. الطبعة الأولى. أكاديمية شرطة دبي.
- حماد، السباعي. (2004). الطبيب وكشف الجريمة. الطبعة الأولى، دار الكتب المصرية.
- نيكول، ديزموند. (2002). مقدمة في الهندسة الوراثية. ترجمة د. عبد القادر عبد الرواف المالح. الطبعة الأولى، الهيئة القومية للبحث العلمي. طرابلس. ليبيا.
- السعدي، علي حمود (2009). الغذاء المهندس وراثياً. الطبعة الأولى، دار الصادق، بابل - العراق.
- هاريس، مورين، أ. وري، أيان، ف. (2009). الطرق العامة لزراعة الخلية. ترجمة د. علي حمود السعدي و د. عبد السلام موسى بو الحاج ، الطبعة الأولى ، دار الصادق، بابل - العراق.